



Ethanol et épigénétique : conséquences neuroplastiques et fonctionnelles chez la souris

Emilien Stragier

► To cite this version:

Emilien Stragier. Ethanol et épigénétique : conséquences neuroplastiques et fonctionnelles chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P604 . tel-01253826

HAL Id: tel-01253826

<https://theses.hal.science/tel-01253826>

Submitted on 11 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

**Ecole doctorale MTCE
Centre de Psychiatrie et Neurosciences**

Thèse de doctorat en Neurosciences

Présentée par

Emilien Stragier

**Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes**

Ethanol et épigénétique : Conséquences neuroplastiques et fonctionnelles chez la souris

Soutenue publiquement le 11 Juillet 2014 devant un jury composé de

**Madame le Docteur Anne-Laurence Boutillier
Monsieur le Professeur Renato Corradetti
Madame le Docteur Martine Cador
Monsieur le Professeur Philip Gorwood
Monsieur le Docteur Gunter Kenis
Madame le Docteur Laurence Lanfumey**

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur**

« Il y a plus de philosophie dans une bouteille de vin que dans tous les livres »

Louis Pasteur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Anne-Laurence Boutillier et le Professeur Renato Corradetti d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur. Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury, le Docteur Martine Cador, le Professeur Philip Gorwood et le Docteur Gunter Kenis d'avoir pris part à l'évaluation de mon doctorat en tant qu'examineur.

Je tenais à adresser un remerciement supplémentaire au Professeur Renato Corradetti et au Docteur Gunter Kenis pour leur participation à cet examen en partie effectué dans une autre langue que la leur. Grazie Professore ! Dank u wel Doctor !

Je remercie plus que chaleureusement le Docteur Laurence Lanfumey pour avoir accepté de diriger ces travaux. Laurence, mille fois merci de m'avoir laissé ma chance il y a un peu plus de 4 ans, je t'en suis profondément reconnaissant ! Je pense que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir en tant que directeur de thèse. Merci d'avoir toujours été disponible, de m'avoir conseillé et soutenu tout au long de ma thèse que ce soit pour l'aspect recherche ou mes activités extra-labo. Merci pour ta patience envers moi, pour tes précieux et judicieux conseils, pour m'avoir permis de faire tout ce que j'ai réalisé pendant ma thèse. Outre ces qualités qui font de toi *une super chef*, je veux également remercier la personne que tu es Laurence, parce que la vie ne s'arrête pas au labo et la recherche ! Merci d'avoir été si humaine ! J'en profite également pour te remercier de m'aider pour la suite de ma carrière professionnelle. J'ai adoré travailler avec toi pendant ces 4 années, j'en garderai un souvenir intarissable, donc encore une fois, MERCI.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Michel Hamon qui a également joué un grand rôle dans l'accomplissement de ce travail. Tout d'abord Michel, merci d'avoir contribué à l'obtention de mon financement de thèse sachant que tu ne me connaissais quasiment pas. Je te remercie également pour le temps que tu as consacré pour la relecture et les corrections de mon article et du reste.

Je remercie à nouveau le Professeur Renato Corradetti pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire à Florence et par conséquent d'avoir contribué à mon séjour inoubliable en Italie. Tu as permis d'enrichir un peu plus ce travail de thèse en me formant à l'électrophysiologie sur tranche et ce n'était pas gagné d'avance ! Renato, merci d'avoir consacré de ton temps pour l'analyse et la correction de ces enregistrements même si j'étais en retard (même pas mal en retard), mais ce sont des résultats obtenus en Italie, ils ont donc pris le style italien !

Je remercie Elisabeth Davenas pour la microdissection laser mais si je peux donner à un conseil aux lecteurs, NE FAITES PAS DE MICRODISSECTION. Je plaisante ! Merci Elisabeth pour être restée avec moi pendant ce long été que nous avons passé à couper. C'était tellement laborieux entre les coupes qui restent collées, le microscope qui tombe en panne ou encore le laser qui faisait des coupes dignes d'un film de science fiction. Même si parfois le

désespoir d'en voir le bout prenait le dessus, nous y sommes arrivés et j'en garde un bon souvenir. Et puis aussi, on s'est bien marré !

Je remercie aussi David Geny pour l'impeccable formation au microscope confocal qui m'a permis d'obtenir les magnifiques photographies d'hippocampes triplement marqués.

Je remercie maintenant toutes les personnes qui sont mes collègues/amis. Cédric, c'est en parti grâce à toi que j'ai pu faire ma thèse ici alors merci mais attention, pas de c***-***e ! Vincent, énorme merci pour tous les services que tu m'as rendu depuis que tu es arrivé au labo et merci aussi pour toutes tes blagues (plus ou moins bonnes) dont la meilleure pour moi est « ahhh le poney ». Saïdou, si tu savais à quel point ça m'a fait du bien que tu me racontes toutes tes histoires pendant la rédaction de ce manuscrit, surtout quand je saturais ! Aaanneeeeeeee, tu as été en quelque sorte le bouc émissaire de nos blagues, reste toi-même tu es tellement drôle, enfin essaie de te calmer sur la soufflerie et arrête d'embêter Saïd ! Merci à ma très chère désagréable maladroite Adeline, toujours partante pour aller boire une bière. Ma p'tite Elenos, toujours tête en l'air, à l'arrache et les idées mal placées, as-tu changé de blouse ? Merci à toi Fabite pour nos discussion très *BDNF* et ta nonchalance, sauf en cas de pot ! Touff, ta blondeur, ta naïveté et ton syndrome d'*Asian Flush* (si tu veux savoir pourquoi, il faut que tu lises ma thèse) nous manquent tellement. Merci à mon ancienne voisine de paillasse, Elo, avec qui j'ai eu des fous rires en manip', as-tu mis le triton ? Merci à Cômille du ch'nord qui n'accepte pas un pot sans alcool, non mais ou va-t-on ? Tu veux qu'on essaye d'autres portiques de sécurité ? Ma chère Sanou et ton rire tellement communicatif, une course contre une souris la prochaine fois ? Et Florent, pas de sieste pendant la soutenance hein ? Merci à Renaud de m'avoir aidé à lancer ce projet et Marine, toujours de bonne humeur et prête à rire, au fait c'est quand tu veux pour aller boire un verre tous ensemble ! Enfin merci à toutes les autres personnes qui ont rendu le quotidien au labo tellement agréable et convivial, dans le désordre : Caroline – il est bon le cassoulet ?, Marion, Justine, Corinne – merci infiniment pour les dernières manip's de thèse, Natacha, Jean-François, Matthieu, Raymond – merci pour le point de vue Québécois sur les manip's de comportement, Mathilde, Michèle D, Samy – tu nous refais un cari poulet sans lait de coco périmé ?, Sylvie, Boris, Martine – la star parmi les secrétaires gestionnaires, Christel, Koen et Pierre-Yves – désolé mais vous dissocier serait à l'encontre de votre attitude au labo, Lucila, Artemis – on va bien réussir à se le faire ce bar spécial non ?, Marion, Xavi – je suis toujours partant pour le gastrobar à BCN, et un petit coucou au gens du 6^{ième} et 7^{ième} étage.

Je continue en remerciant les étudiants avec lesquels j'ai travaillé et qui m'ont aidé sur ce projet ou sur d'autres : Victor, Dan, Jeanne, Martin, Edouard.

Merci aussi à Alessio, Cindy, Gomez, Gilda, Giovanna, Teresa, Federica et Gustavo qui ont rendu mon séjour Florentin hors du commun !

Je remercie chaleureusement mes amis hors labo qui ont été là dans les bons et mauvais moments. Micka et la Tour Eiffel, heuuu pardon l'Arc de triomphe ! Je n'arrive pas toujours à te comprendre, un jour quelqu'un devrait décider de t'étudier ! Jérôme, merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi, et merci d'avoir géré la logistique ! On se retrouve à la Casa ? Céline, tu fumes s***** ? J'y réfléchirai à deux fois avant d'accepter une

nouvelle invitation de ta part pour un ciné. Cédric, te revoilà ici ! J'espère que tu as ramené du calva maison et préparé une bonne quiche pour le pot ? Amélie, merci beaucoup d'avoir contribué à ce que je puisse rejoindre ce labo et merci pour ton soutien pendant ces années. Merci aussi à mes amis Normands. A toi mon bichon, pour tous ces moments de délire et de déconnade qu'on a passé ensemble que ce soit à Dieppe, dans la campagne normande, à Rouen, à Bréda, à Paris, en camping (souviens toi la Vendée). Merci aussi à ma p'tite Kèvre pour ces excellents commérages et fous rires sur les bancs de la fac de Rouen et surtout pour ces soirées inoubliables, dédicace pour toi commère : ah oui, j't'ai pas raconté !! Et aussi les Normands-Parisiens. So et JB, je crois que maintenant je suis prêt, psychologiquement, à affronter Kumar, je vais enfin pouvoir tester l'abricot de chez Leader Price. Mes vieux potes du lycée, Maxou et Salomé, à quand des travaux dans un nouvel appartement que je puisse lancer des œufs par la fenêtre ?

J'avais dit que je le ferai : merci à la gentille et patiente hôtesse de l'air du vol EasyJet Paris – Milan du 28 Février 2014 à 11 :05 pour m'avoir donné de l'inspiration (il n'y a pas de sous-entendu).

Et je terminerai en remerciant ma famille que j'adore ! Maman, tellement entêtée mais on sait que c'est parce que tu nous aimes, on fait Happy Hour ? Didier, merci de faire parti de nos vies, tu as toujours été là attentif et intéressé, continu de faire tes *pizze*. Ma vieille sœur Camille, jamais plus je n'irai chercher des « chaises » pour toi, promis on se fait ce bateau très vite ! Ma p'tite sœur Charlotte, globe trotteuse et polyglotte, attention à la Vodka, c'est quoi la prochaine destination que je prenne mes billets ? Merci aussi à Yann et mes grands-parents René et Yvette. Vous avez tous cru en moi et m'avez soutenu tout au long de mon parcours alors un grand MERCI.

Emilien

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES PUBLICATIONS	12
RESUMES.....	14
INTRODUCTION GENERALE	17
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	22
I - L'ETHANOL	23
A – L'addiction à l'alcool ou l'alcool-dépendance	23
B – Les modèles d'alcoolisation chez le rongeur.....	24
1 – Les protocoles d'exposition forcée.....	25
2 – Les protocoles de consommation spontanée	25
3 – Les modèles génétiques de prise d'alcool	26
4 – Les souris C57BL/6J	28
C - Neurobiologie de l'alcoolisme	29
1 - Les systèmes impliqués dans l'alcool-dépendance	29
a - Le système GABAergique	29
b - Le système glutamatergique.....	30
c - Les autres systèmes	33
2 – De la simple prise d'alcool à l'addiction.....	34
a – La prise aiguë d'éthanol	35
b – Maintien de la consommation d'alcool et neuroadaptation.....	38
c – La recherche compulsive, le sevrage et la rechute.....	42
D – Les facteurs de risques et de susceptibilité	45
1 – L'environnement	45
2 – La génétique	46
3 – L'épigénétique.....	48
II – EPIGENETIQUE.....	50
A – Définition.....	50
B - La chromatine et le nucléosome	50
C – Les histones	51
D – Les modifications post-traductionnelles des histones.....	52
1 – L'acétylation.....	53
2 – La méthylation.....	58
3 – Autres modifications post-traductionnelles des histones.....	60
4 – Récapitulatif des modifications post-traductionnelles.....	62
5 – Le « code » des histones.....	62
E – La méthylation de l'ADN	63
1 – Contrôle de la méthylation	64

2 – Contrôle de la transcription génique.....	66
3 – Déméthylation de l'ADN	66
F – Ethanol et épigénétique : de la prise aiguë à l'addiction.....	67
1 – Effet d'une prise aiguë	67
2 – Effet d'une prise chronique	68
a – La méthylation de l'ADN	68
b – Les modifications des histones.....	70
III – NEUROGENESE ADULTE ET PLASTICITE.....	74
A – L'hippocampe.....	76
1 – Les connectivités	76
2 - La zone sous-granulaire du gyrus denté et la neurogenèse	78
3 – La régulation de la neurogenèse	80
a – La régulation par les facteurs de transcription.....	80
b – La régulation dépendante de l'activité	83
c – La régulation par les facteurs neurotrophiques.....	84
B – BDNF et contrôle de la plasticité.....	87
1 – Expression du BDNF.....	87
2 – La signalisation BDNF-TrkB	89
3- BDNF et LTP	91
4- BDNF et mémoire.....	93
C – La neurogenèse et la mémoire	94
D – L'éthanol et l'hippocampe.....	97
1 – La neurogenèse et l'éthanol.....	97
2 – Le BDNF et l'éthanol	98
3 – Les signalisations du BDNF et l'éthanol.....	99
OBJECTIFS DE L'ETUDE	103
RESULTATS EXPERIMENTAUX	106
ARTICLE 1	107
Ethanol-induced epigenetic regulations at <i>Bdnf</i> gene in C57BL/6J mice	107
Supplementary information.....	118
Supplementary Materials and Methods.....	119
Supplementary tables	124
Supplementary figures.....	130
ARTICLE 2	131
Chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induces cognitive deficits, and alterations in BDNF signaling and epigenetic regulation	131
Supplementary information.....	155
Supplementary tables	156
Supplementary figure	159
Résultats supplémentaires	160
DISCUSSION GENERALE	170
I – L'influence de l'éthanol sur la neurogenèse : le BDNF, unique acteur ?	171
II – Les liens entre la prise d'éthanol et les régulations épigénétiques : mécanismes de la neuroadaptation ?	176

III – La prise d'éthanol influence la plasticité synaptique : une évidence ?.....	181
IV – L'éthanol et la mémoire : une relation conflictuelle	184
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	188
EPILOGUE.....	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193

ABREVIATIONS

ADH : alcool déshydrogénase

ADN : acide désoxyribonucléique

AKT : protéine kinase B

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

bHLH : facteur de transcription appartenant à la famille *basic Helix-Loop-Helix*

CA1-4 : corne d'Ammon 1-4

CaMKII : calcium-calmodulin dependent kinase

CB : cannabinoïde

CBP : CREB-binding protein

CNTF : ciliary neurotrophic factor

CpG : cytosine-pont phosphodiester-guanine

CREB : Cyclic-AMP Response Element-binding protein

DCX : doublecortine

DG : gyrus denté

DNMT : ADN méthyltransférase

EC : cortex entorhinal

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FGF : fibroblast growth factor

GABA : acide gamma-amino-butyrique

GCL : couche de cellules granulaires

GFAP : glial fibrillary acidic protein

H1-4 : histone H1-4

HAT : histone acétyltransferase

HKMT : histone méthyltransférases sur les lysines

HMT : histone méthyltransferase

HPA : hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HxKyAc : histone x acétylée sur la lysine y

HxKyme1-3 : histone x mono-triméthylée sur la lysine y

IGF : Insulin-like Growth Factor

iGluR : récepteur glutamatergique ionotropique

IL-6 : interleukine-6

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MBD : methyl-binding protein

MBP : methyl-CpG-binding protein

mGluR : récepteur glutamatergique métabotrope

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NaB : sodium butyrate

NGF : nerve growth factor

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NPY : neuropeptide Y

NSC : cellule souche neuronale

NT3-5 : neurotrophine 3-5

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : protéine kinase C

PLC γ : Phospholipase C γ

PTM : modifications post-traductionnelles

p75^{NTR} : récepteur aux neurotrophines p75

REST : RE1 silencing transcription factor

SAM : S-adénosyl-méthionine

SGZ : zone sous-grulaire

SNC : système nerveux central

SNP : single nucleotide polymorphism

TAP : progéniteurs à amplification transitoire

TrkB : tropomyosin-related kinase receptor B

TSA : trichostatine A

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

5-HTT : transporteur de la 5-hydroxytryptamine

5mC : 5-méthylcytosine

LISTE DES PUBLICATIONS

ARTICLES ORIGINAUX

Stragier E, Massart R, Salery M, Geny D, Martin V, Boulle F, Hamon M, Lanfumey L (2014). Ethanol-induced epigenetic regulations at the *Bdnf* gene in C57BL/6J mice. *Mol Psychiatry* 2014 Apr 29. doi: 10.1038/mp.2014.38. [Epub ahead of print]

Aguiar AS Jr, **Stragier E**, Scheffer D, Remor A, Oliveira P, Prediger RD, Latini A, Raisman R, Mongeau R, Lanfumey L (2014). Physical exercise improves mitochondrial function: consequences on neuroplasticity and anxio-depressive disorders. *Neuroscience* 2014 Apr 26. pii: S0306-4522(14)00329-7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.027. [Epub ahead of print]

Ferrand N, **Stragier E**, Redeuilh G and Sabbah M (2012). Glucocorticoids Induce *CCN5* Gene Expression and Attenuate Invasion of Metastatic Human Breast Cancer Cells. *Biochem J.* 447:71-9

En preparation : Chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induces cognitive deficits, and alterations in BDNF signaling and epigenetic regulation

PARTICIPATION A DES OUVRAGES

Stragier E, Massart R, Salery M, Geny D, Hamon M, Lanfumey L, (2013). Contrôles épigénétiques de l'expression du BDNF sous-tendant les effets de l'alcool sur la neuroplasticité cérébrale. *Cahiers de l'Ireb* n°21:85-91

Stragier E, Salery M, Hamon M, Lanfumey L, Massart R (2010). Alcool, neuroplasticité et épigénèse chez la souris. *Cahiers de l'Ireb* n°20:85-92

COMMUNICATIONS ORALES

Stragier E, Massart R, Hamon M, Lanfumey L. Epigenetic modifications of *bdnf* gene at hippocampal level induced by chronic ethanol intake in C57BL/6J mice. 26th ECNP Congress, Barcelona, 5-9 October 2013. *Eur Neuropsychopharmacol* 23 Supp 2, S121-S122

Stragier E, Massart R, Salery M, Geny D, Boulle F, Hamon M, Lanfumey L. Contrôle épigénétiques de l'expression du BDNF sous-tendant les effets de l'alcool sur la neuroplasticité cérébrale. 21^{ème} colloque de l'IREB, Paris, 13-14 mars 2013

Stragier E, Salery M, Hamon M, Lanfumey L, Massart R. Alcool, neuroplasticité et épigénèse chez la souris. 20^{ème} colloque de l'IREB, Créteil, 8-9 décembre 2010

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- Stragier E**, Martin V, Davenas E, Poilbout C, Mongeau R and Lanfumey L. Chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induces BDNF epigenetic and signaling alterations, and cognitive deficits. 27th ECNP Congress, Berlin, 18-21 October 2014
- Stragier E**, Massart R, Hamon M, Lanfumey L. Chronic ethanol intake-induced epigenetic modifications at *bdnf* gene level in the mouse hippocampus. 14th ESBRA Congress, Warsaw, September 2013. *Alcohol and Alcoholism* (2013) 48 (suppl 1): i41-i46
- Stragier E**, Massart R, Hamon M, Lanfumey L. Epigenetic modifications after voluntary and chronic ethanol intake in the C57BL/6J mice hippocampus. 11^e colloque de la société française des neurosciences, Lyon, 21-24 mai 2013
- Stragier E**, Massart R, Hamon M, Lanfumey L. Epigenetic modifications of *bdnf* gene at hippocampal level induced by chronic ethanol intake in C57BL/6J mice. ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe, Nice, March 2013. *Eur Neuropsychopharmacol* 23 Supp 1: S61-S62
- Stragier E**, Massart R, Hamon M, Lanfumey L. Chronic ethanol intake-induced epigenetic modifications at *bdnf* gene level in the mouse hippocampus. Abstract number 2151, 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, July 2012
- Raisman-Vozari R, Aguiar A S Jr, Boemer G, Duzzioni M, Matheus FC, **Stragier E**, Chevarin C, Lanfumey L, Latini A, Prediger RDS. Further evidence of the neuroprotective effects of physical exercise in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) mouse model of Parkinson's disease. Program No. 52.16/Y24 2011 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2011. Online
- Stragier E**, Hamon M, Massart R, Lanfumey L. Modifications épigénétiques induites par la prise d'alcool volontaire et chronique chez les souris C57BL/6J. Journée annuelle de l'AFPBN, Paris, 1-2 avril 2011
- Stragier E**, Hamon M, Massart R, Lanfumey L. Epigenetic modifications after voluntary and chronic alcohol intake in C57BL/6J mice. Colloque Médecine et Recherche de l'IPSEN, Epigenetics, Brain and Behavior, Paris, 18 avril 2011
- Stragier E**, Hamon M, Massart R, Lanfumey L. Alcohol, neuroplasticity and epigenesis in mice. 10^e colloque de la société française des neurosciences, Marseille, 24-27 mai 2011
- Stragier E**, Hamon M, Massart R, Lanfumey L. Alcohol, neuroplasticity and epigenesis in mice. Colloque international IFR83, Epigenetics: from bases to pathology, Paris, October 12-14, 2011.

RESUMES



Ethanol et épigénétique : conséquences neuroplastiques et fonctionnelles chez la souris

La consommation chronique et excessive d'éthanol provoque des modifications neurobiologiques adaptatives. Les mécanismes qui les contrôlent sont multiples et certains ont été reliés à des régulations épigénétiques conduisant à des modifications structurales et fonctionnelles. L'éthanol induit également une neurodégénérescence de l'hippocampe responsable de déficits cognitifs.

Parmi l'ensemble des modèles animaux qui sont utilisés pour étudier les effets d'une consommation chronique d'alcool, figurent les souris de la lignée C57BL/6J. Ces souris possèdent une appétence naturelle pour l'éthanol faisant d'elles un modèle de choix pour étudier les conséquences de la consommation chronique d'éthanol. Le but de ce travail de thèse a été d'étudier les relations entre les mécanismes épigénétiques et la modulation de la neuroplasticité de l'hippocampe à la suite d'une consommation chronique d'éthanol chez les souris C57BL/6J, et d'en évaluer les conséquences comportementales.

Nous avons montré que la consommation chronique d'éthanol induit, au niveau de l'hippocampe, des modulations épigénétiques globales corrélées à un remodelage chromatinien au sein du gène du BDNF, impliquant à la fois les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN. Ces modifications épigénétiques sont certainement responsables de l'augmentation d'expression protéique du BDNF observée dans l'hippocampe, et plus particulièrement dans le gyrus denté, après 3 semaines de consommation chronique d'éthanol en libre choix. L'accroissement de l'expression du BDNF induit une stimulation des voies de la signalisation intracellulaire dépendantes de l'activation du récepteur TrkB du BDNF, et une augmentation de la neurogenèse du gyrus denté. Les effets de l'antagoniste spécifique du récepteur TrkB, ANA 12, démontrent que l'augmentation de la neurogenèse observée chez les souris C57BL/6J après la prise chronique d'éthanol, est sous le contrôle unique du complexe BDNF/TrkB. L'analyse comportementale des souris C57BL/6J ayant consommé de l'éthanol, montre une détérioration des capacités d'apprentissage et de mémoire sans modification de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, suggérant ainsi que d'autres mécanismes sont impliqués dans ces déficits cognitifs.

L'ensemble de ces données apporte de nouveaux éléments de compréhension concernant la stimulation de la neurogenèse hippocampique chez les souris C57BL/6J lors d'une consommation chronique en libre choix d'éthanol. Il est probable que cette apparente augmentation de plasticité soit un mécanisme adaptatif et compensatoire à la détérioration des fonctions cognitives induite par une consommation chronique d'alcool.



Ethanol and epigenetic: neuroplastic and functional consequences in mice

Chronic and excessive ethanol consumption triggers neurobiological adaptations within the central nervous system, which are responsible for the development of an addiction. Ethanol induces adaptive mechanisms linked to epigenetic regulations leading to functional and structural changes, and also provokes a neurodegeneration responsible for the cognitive deficits observed in alcohol abusers.

Among the different animal models available for studying the effects of chronic ethanol consumption, C57BL/6J mice are among the most relevant. These mice display high ethanol preference, making them a good model for studying the consequences of chronic and free-choice ethanol consumption. The purpose of this work was to study the links between epigenetic mechanisms and hippocampal neuroplasticity and to evaluate the behavioural consequences induced by chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice.

We showed that, in the hippocampus, chronic ethanol consumption induced global epigenetic modulations that were correlated with chromatin remodelling at the BDNF gene level. These effects involved post-translational histone modifications and DNA methylation. Epigenetic changes at the BDNF gene level probably allowed the increase in BDNF protein expression observed within the hippocampal dentate gyrus in mice having consumed ethanol for 3 weeks. Upregulation of BDNF expression was linked to both the stimulation of intracellular cascades downstream BDNF/TrkB receptor activation, and the increase in neurogenesis within the dentate gyrus. Using a specific TrkB receptor antagonist, ANA-12, we demonstrated that the hippocampal neurogenesis induced by chronic ethanol intake was under the control of BDNF. Behavioural analysis evidenced learning and memory impairments after ethanol consumption without synaptic plasticity alteration within the hippocampus, suggesting the involvement of other mechanisms in the cognitive deficits.

Altogether, these data bring new elements for understanding the hippocampal neurogenesis stimulation observed under chronic and voluntary ethanol consumption in C57BL/6J mice. Moreover, this apparent increase in plasticity might probably be considered as an adaptive and compensatory mechanism in response to the cognitive deficits induced by ethanol consumption.

INTRODUCTION GENERALE



Copyright © IREB 2014

INTRODUCTION GENERALE

De part son histoire et ses traditions, la France est un pays où la population consomme culturellement de l'alcool. Au milieu du XX^e siècle, le niveau de consommation d'alcool en France était largement au dessus de celui observé dans les autres pays européens. Depuis 1961, les quantités d'alcool pur consommées par an et par habitant âgé de 15 ans et plus, ont diminué de 50 %. Malgré cette baisse, la France reste un des pays consommant le plus d'alcool au monde. Cette absorption soutenue mène inévitablement vers des consommations et des consommateurs à risque. Dans la population adulte (18-75 ans), on estime que 10 % des consommateurs sont en difficulté avec l'alcool (OFDT : Observatoire français des drogues et des toxicomanies). L'usage répété et excessif de l'alcool peut conduire au développement d'une alcoolo-dépendance.

Au niveau cérébral, la consommation chronique d'alcool s'accompagne de modifications neurobiologiques qui permettent une adaptation à cette consommation et le développement de la tolérance aux effets de l'alcool. Ce remodelage des connections cérébrales, ainsi que les modifications de la neurotransmission qui découlent de cette adaptation, sont la cause des modifications comportementales observées lors des phases d'abstinence comme par exemple un niveau plus haut d'anxiété. Cette adaptation est en outre liée à la modulation génique d'enzymes responsables de la répression transcriptionnelle de certains gènes, suggérant ainsi un remodelage du paysage épigénétique après une prise d'alcool (Moonat *et al.*, 2013). En plus de ces mécanismes adaptatifs, la consommation chronique et prolongée d'alcool induit une neurodégénérescence associée à des atteintes cognitives sévères. Cette neurodégénérescence a été reliée à des carences en vitamine B1 amenant au syndrome de Korsakoff, qui est la conséquence d'une diminution du volume des structures cérébrales impliquées dans les propriétés mnésiques, telles que l'hippocampe

(Sullivan and Pfefferbaum, 2009). L'hippocampe est une des rares régions du cerveau où il est possible d'observer une neurogenèse chez l'adulte. Cette forme de plasticité, observée seulement au niveau du gyrus denté, est reliée aux capacités cognitives et est indispensable à l'encodage des nouvelles informations issues de l'environnement d'un individu. La neurogenèse est contrôlée par de nombreux facteurs cellulaires et environnementaux comme par exemple les facteurs neurotrophiques, les facteurs neuronaux de transcription, ou encore le stress et l'exercice physique. La consommation d'alcool, comme attendue, perturbe négativement la neurogenèse (Jang *et al.*, 2002 ; Richardson *et al.*, 2009), et ce phénomène est corrélé à des modifications de la machinerie transcriptionnelle et signalétique régulant cette forme de plasticité (Davis, 2008) et à des déficits cognitifs (Obernier *et al.*, 2002a).

De façon inattendue, à la suite d'une consommation chronique d'alcool en libre choix, certains animaux, comme les souris de la lignée C57BL/6J, présentent au contraire une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Aberg *et al.*, 2005). Ces souris, contrairement aux autres modèles animaux, possèdent une préférence spontanée pour l'alcool. Chez ces mêmes souris, l'exposition chronique à l'alcool induit une amélioration de certaines capacités cognitives une fois âgées (Krazem *et al.*, 2003). Le fait d'observer chez ces souris une stimulation de la prolifération cellulaire dans cette région du cerveau très sensible aux effets de l'alcool, associée à une amélioration de la cognition est pour le moins surprenant et a motivé notre recherche. L'ensemble de ce travail de thèse a donc porté sur l'étude des conséquences d'une prise d'alcool chez ces souris, qui montrent une appétence élevée pour cette substance. Sur la base d'un protocole de consommation d'alcool chronique en libre choix, nous nous sommes intéressés aux relations pouvant exister entre les mécanismes épigénétiques et la modulation de la neuroplasticité dans l'hippocampe. La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une synthèse bibliographique. Nous décrirons les principaux mécanismes neurobiologiques impliqués dans les effets de la prise

d'alcool et dans le développement de l'alcool-dépendance. Nous détaillerons ensuite les mécanismes de régulation épigénétique et l'impact de la consommation d'alcool sur ces derniers. Enfin nous terminerons par la neuroplasticité de l'hippocampe et l'effet de l'exposition à l'alcool sur cette structure, les acteurs de la régulation de la neurogenèse et les conséquences sur les performances mnésiques. La deuxième partie sera consacrée aux résultats expérimentaux obtenus durant ce travail de thèse qui font l'objet de deux articles. Enfin, dans la dernière partie, nous discuterons ces résultats dans le contexte de la littérature actuelle et nous proposerons des hypothèses et des voies de recherche possibles.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I - L'ETHANOL

L'éthanol est une molécule obtenue par fermentation ou distillation de végétaux riches en sucre. Il rentre dans la composition des boissons alcooliques couramment consommées par la population telles que le vin, la bière ou encore les eaux-de-vie. En 2011, le rapport de l'observatoire français des drogues et des toxicomanies (OFDT) recensait en France métropolitaine environ 41,2 millions de consommateurs dont 8,8 millions de consommateurs réguliers, c'est-à-dire ayant au moins trois consommations d'alcool par semaine. La France fait partie des pays de forte consommation d'alcool ce qui fait de l'abus d'alcool un véritable problème de santé publique.

A – L'addiction à l'alcool ou l'alcoololo-dépendance

La consommation d'alcool est pour la plupart un plaisir social mais un nombre significatif d'individus deviennent incapables de contrôler leur consommation et dérivent alors vers l'addiction. L'addiction vient du latin « *addicere* » qui signifie se donner ou se lier à une chose ou à un être.

L'alcool fait partie des substances dites psycho-actives et est classé dans les drogues d'abus pouvant entraîner une dépendance, on parle alors d'alcoololo-dépendance ou d'alcoolisme. L'alcoololo-dépendance est définie comme « une sujétion à la prise de boisson contenant de l'éthanol, dont la suppression a pour conséquences l'apparition d'un malaise psychique, de troubles psychiques, ou des deux à la fois » (Dictionnaire de l'Académie de Médecine, version 2013). Elle est caractérisée par (1) un besoin compulsif de consommer, (2) une augmentation de la quantité consommée due au développement d'une tolérance aux effets de l'alcool et (3) l'apparition de symptômes de sevrage à l'arrêt de la prise d'alcool.

L'alcoololo-dépendance est influencée par des traits de caractère comme par exemple l'anxiété. L'environnement et le patrimoine génétique peuvent agir sur la motivation à

consommer de l'alcool et ainsi augmenter la susceptibilité au développement de l'addiction. Nous reviendrons sur les facteurs de risque et de susceptibilité à l'alcool-dépendance plus tard dans ce chapitre.

A l'inverse d'autres drogues d'abus qui agissent sur des cibles spécifiques, l'alcool, ou sa molécule psycho-active l'éthanol, induit des effets très larges dans le système nerveux central (SNC). Il peut agir sur une grande variété de cibles, situées aussi bien sur des membranes cellulaires que sur des éléments intracellulaires, et son action conduit à des modulations des récepteurs des neurotransmetteurs et neurohormones. L'éthanol affecte le système dopaminergique, cannabinoïde et sérotoninergique mais les systèmes GABAergique et glutamatergique restent de loin ceux qui sont le plus altérés par l'éthanol et une partie de cette étude bibliographique leur sera consacrée (voir ci-dessous).

B – Les modèles d'alcoolisation chez le rongeur

De nombreux modèles animaux ont été développés dans le but d'étudier les effets neurobiologiques de l'éthanol. Cependant, ces modèles peuvent être considérés comme sommaires au vue de la complexité de cette pathologie multifactorielle et la réplique exacte de l'alcool-dépendance humaine est loin d'être atteinte. Néanmoins, les différents modèles présentés ci-après permettent d'étudier certains aspects (génétiques, comportementaux) de cette pathologie afin d'identifier de possibles mécanismes responsables de l'addiction à l'alcool.

La consommation d'éthanol chez les animaux peut être induite de deux façons :

- une exposition forcée lorsque les animaux reçoivent l'éthanol au moment où l'expérimentateur le décide ;
- une consommation spontanée lorsque les animaux décident d'eux même de consommer l'éthanol qui est à leur disposition.

1 – Les protocoles d'exposition forcée

Bien que les protocoles d'alcoolisation forcée s'éloignent de la réalité de la consommation humaine, ils ont comme intérêt de rendre les animaux dépendants à l'alcool. Il existe différents modes opératoires : l'éthanol peut être administré par voie intraveineuse, intra-péritonéale, intra-gastrique, ou encore par inhalation par voie pulmonaire. Dans ce dernier mode opératoire, initié en 1975 par B. Le Bourhis, les animaux sont placés dans des chambres dans lesquelles circulent des vapeurs d'éthanol dont la concentration peut être augmentée progressivement (Aufrère *et al.*, 1997).

Enfin, l'animal peut ingérer de l'éthanol lorsqu'il ne se voit offrir qu'une boisson alcoolisée comme seule source de liquide (Lumeng *et al.*, 1977 ; Nevo *et al.*, 1995). Cette boisson alcoolisée peut être parfois édulcorée (Waller *et al.*, 1982), sucrée, ou mélangée à la nourriture (liquide « Lieber DeCarli ») (Frye *et al.*, 1983 ; Devaud *et al.*, 1995).

2 – Les protocoles de consommation spontanée

Bien qu'il soit difficile de rendre les animaux dépendants vis-à-vis de l'éthanol dans une procédure de libre choix, celle-ci reste néanmoins d'un grand intérêt dans la mesure où elle permet d'évaluer la préférence (appétence) ou au contraire l'aversion pour l'alcool.

Dans cette procédure, les animaux ont le choix entre un biberon d'eau et un biberon contenant une solution alcoolisée. L'accès à ces biberons peut être permanent ou limité à quelques heures. La concentration d'alcool peut être fixe, généralement 8 ou 10 % (vol/vol), ou augmentée progressivement, par exemple de 3 à 20 % en quelques jours (Crabbe *et al.*, 1996). Il a été montré que les faibles concentrations d'éthanol sont peu discriminantes, tandis que les trop fortes concentrations exercent un effet aversif. Par ailleurs, la consommation volontaire d'éthanol est fonction de l'offre : si plusieurs biberons de solutions alcoolisées de même concentration (Tordoff and Bachmanov, 2003) ou de concentrations différentes (Bell *et*

al., 2003 ; Serra *et al.*, 2003) sont proposés simultanément aux animaux (le biberon d'eau non alcoolisée restant toujours à disposition), la consommation est plus importante. Ainsi, nous pouvons induire un processus d'alcoolisation avec une augmentation progressive des concentrations identiques en éthanol dans plusieurs biberons avec en plus un biberon contenant de l'eau (Kelai *et al.*, 2008 ; Molet *et al.*, 2012 ; Stragier *et al.*, 2014).

Une autre procédure pour provoquer une consommation importante consiste (1) à maintenir les animaux « en alcoolisation », puis (2) à les priver d'éthanol (c'est l'abstinence forcée), et enfin (3) à les remettre en présence d'éthanol. La consommation est alors majorée après abstinence : c'est « l'effet de privation » largement décrit (Salimov and Salimova, 1993 ; Wolffgramm and Heyne, 1995 ; Spanagel *et al.*, 1996 ; Heyser *et al.*, 1997).

Enfin, un autre mode d'administration est celui du conditionnement opérant où l'animal doit apprendre à effectuer une tâche (en général appuyer sur un levier) pour obtenir la délivrance d'une quantité déterminée d'éthanol.

3 – Les modèles génétiques de prise d'alcool

Il est intéressant de noter que, dans la nature, il n'existe aucune souche « sauvage » de rats ou de souris spontanément « alcoolopréférante ». Les modèles dont nous disposons à l'heure actuelle ont tous été dérivés par l'homme et proviennent soit de lignées génétiquement sélectionnées pour leur préférence pour l'alcool, soit d'animaux ayant acquis cette préférence par apprentissage (conditionnement opérant).

En croisant entre eux des rats ayant soit une préférence élevée soit une préférence faible pour l'éthanol lors d'un protocole de libre choix, des chercheurs ont pu créer des lignées de rats « alcoolopréférants » et « non alcoolopréférants ». A l'heure actuelle, plusieurs lignées de rats sont d'utilisation courante :

- **UchB/UchA** : University of Chile B and A (Chili), (Mardones and Segovia-Riquelme, 1983) ;
- **AA/ANA**: Alko Alcohol – Alko Non Alcohol (Finlande), (Eriksson, 1968); à l'origine d'une lignée dérivée : **cAA/cANA** (c : Cologne, Allemagne) (Maurel *et al.*, 1999) ;
- **HAD/LAD**: High and Low Alcohol Drinking (Etats-Unis), (Gongwer *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1993) ;
- **P/NP**: Preferring / Non Preferring (Etats-Unis) (Lumeng *et al.*, 1977) ;
- **SP/SNP**: Sardinian Preferring / Sardinian Non Preferring (Italie) (Fadda *et al.*, 1989), à l'origine d'une lignée dérivée : **mSP** : Marchigian Sardinian alcohol-preferring (Italie), (Ciccocioppo *et al.*, 1999).

Même si ces lignées ont toutes été sélectionnées sur la base du même critère, elles diffèrent sur de nombreux points comme leur sensibilité à l'éthanol, leur niveau d'anxiété ou encore les taux de certains neurotransmetteurs. Ces lignées ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études visant à décrire les différences neurobiologiques potentiellement à l'origine de leurs phénotypes.

D'autres lignées sélectionnées par l'expérimentateur sur la base d'autres critères que leur consommation d'éthanol se sont avérées présenter également une préférence particulière pour l'éthanol. Ainsi le rat Fawn-Hooded est « alcoololo-préférant » contrairement au rat Wistar, ou au rat Wistar-Kyoto.

Chez la souris aussi on retrouve de telles différences. Depuis les travaux de McClearn (1959), les souris C57BL/6J ont été identifiées comme « alcoololo-préférantes » (Hillman and Schneider, 1975 ; Yoshimoto and Komura, 1989 ; Grahame and Cunningham, 1997), et les souris DBA/2J comme « alcoololo-aversives » (Yoshimoto and Komura, 1989 ; Grahame and Cunningham, 1997).

Les autres lignées connues semblent avoir une préférence intermédiaire pour l'éthanol. De fait, après un protocole de libre choix s'étalant sur quatre jours (eau versus solution alcoolisée à 6%), il est possible d'établir le classement suivant, dans l'ordre décroissant de quantité d'alcool ingérée : C57BL/6J > 129/Sv-ter > BALB/C > AJ > DBA/2J (Belknap *et al.*, 1993 ; Crabbe *et al.*, 1999).

4 – Les souris C57BL/6J

Les souris C57BL/6J sont celles qui ont été utilisées pour ce travail de thèse, et nous leur consacreront une partie de ces rappels bibliographiques. Ces souris sont issues du « Jackson Laboratory » et élevées chez Charles River.

Les C57BL/6J sont les seules souris à avoir une consommation spontanée élevée que ce soit dans un protocole d'alcoolisation de libre choix comme mentionné précédemment ou dans un test de conditionnement opérant (Belknap *et al.*, 1993 ; Crabbe *et al.*, 1999 ; Risinger *et al.*, 1998). Néanmoins, elles paraissent être peu sensibles aux propriétés renforçantes de l'éthanol dans le test de préférence de place conditionnée (Brodie and Appel, 2000).

Ces souris présentent un métabolisme de l'éthanol moins rapide que d'autres lignées car leur éthanolémie suite à une administration par gavage est plus élevée comparée à d'autres souris (Desroche *et al.*, 1995). Cependant, lors d'administration par injection intrapéritonéale, l'éthanolémie des C57BL/6J est identique à celle d'autres souches. L'activité de l'alcool déshydrogénase gastrique semble être responsable de ces différences car elle est moins efficace chez les C57BL/6J que chez d'autres souris, expliquant ainsi une dégradation moindre de l'éthanol au niveau de la barrière gastrique (Desroches *et al.*, 1995).

Concernant leur réactivité comportementale, ou sensibilité, à l'éthanol, les C57BL/6J ne semblent pas différer des autres souches de souris. L'étude menée par Crabbe et ses collaborateurs (1995), n'a pas montré de différences de scores sur 18 tests comportementaux

permettant de déterminer la sensibilité des animaux à l'éthanol (ataxie, tremblements, sédation, etc.). Par ailleurs, ces souris présentent des symptômes de sevrage (convulsions) extrêmement faibles à la suite de l'interruption d'une prise chronique d'alcool (Crabbe *et al.*, 1983 ; Belknap *et al.*, 1993).

Au niveau neurobiologique, les C57BL/6J présentent des concentrations de dopamine inférieures à celles de la souche DBA/2J, qui, quant à elles, présentent une faible préférence pour l'alcool (George *et al.*, 1995), et des études électrophysiologiques ont montré des réponses dopaminergiques faibles chez les souris C57BL/6J (Brodie and Appel, 2000). Ces données suggèrent un hypodopaminergie et donc une réponse moindre de ce système aux effets de l'éthanol. Rappelons que ce système est central dans la réponse aux drogues et aux propriétés récompensantes de celles-ci.

C - Neurobiologie de l'alcoolisme

1 - Les systèmes impliqués dans l'alcoolodépendance

a - Le système GABAergique

Dans le système nerveux central des mammifères, l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur (Barnard *et al.*, 1998 ; Obata, 2013). Les neurones produisant et sécrétant le GABA sont principalement des inter-neurones. Le GABA peut se lier à deux types de récepteurs GABAergiques, des récepteurs ionotropiques perméables aux ions chlorures (GABA_A et GABA_C) et des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G (GABA_B) (Chebib and Johnston, 1999). De nombreux composés peuvent se lier à ces récepteurs et ainsi moduler leur activité. Plus particulièrement, le récepteur GABA_A (GABA_AR) peut lier les benzodiazépines, les stéroïdes, les barbituriques ou encore l'éthanol sur des sites spécifiques (Chebib and Johnston, 1999). Ces récepteurs sont

composés de plusieurs sous-unités : α , β , γ et δ (Barnard *et al.*, 1998 ; Mihic *et al.*, 1997) et sont distribués ubiquitairement au niveau des synapses, des dendrites et des axones. Ils sont impliqués dans l'inhibition synaptique phasique ou tonique et leur ouverture est initiée par l'association extracellulaire du GABA sur un site de liaison du récepteur permettant un changement conformationnel du canal devenant alors perméable aux ions chlorures (Barnard *et al.*, 1998). La localisation post-synaptique des récepteurs est responsable de l'inhibition phasique en réponse à une libération brève de fortes concentrations de GABA dans la fente synaptique par les neurones pré-synaptiques. Le GABA qui s'échappe de la fente synaptique peut également activer les récepteurs pré-synaptiques. Des études ont montré que l'éthanol pouvait agir sur la transmission GABAergique à la fois au niveau post- et pré-synaptique (Ming *et al.*, 2006). De faibles concentrations en GABA au niveau extracellulaire provoquent une activation des GABA_AR extra-synaptiques responsables de l'inhibition tonique (Farrant and Nusser, 2005). L'exposition chronique à l'éthanol induit des modifications de répartition de certaines sous-unités des GABA_AR extrasynaptiques et synaptiques qui seraient impliquées dans le développement de la tolérance à l'éthanol (Liang *et al.*, 2006). Ces mécanismes seront expliqués plus tard dans ce chapitre.

b - Le système glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant dans le système nerveux central des mammifères. Comme le GABA, il peut se lier à des récepteurs ionotropiques (iGluR : AMPA et NMDA) et métabotropiques (mGluR) (Green and Nayeem, 2014 ; Yin and Niswender, 2014). Les mGluR sont couplés aux protéines G et peuvent induire après fixation du ligand, deux types d'effets. Une partie des mGluR permet l'hydrolyse du phosphoinositide, ce qui conduit à un accroissement de l'excitation neuronale par l'intermédiaire des récepteurs iGlu perméables aux ions (Ferraguti and Shigemoto, 2006)

tandis qu'une autre partie de ces récepteurs est négativement couplée à l'adénylyl cyclase aboutissant à une modulation négative de la libération synaptique du glutamate (Ferraguti and Shigemoto, 2006 ; Olive, 2009 ; Pomierny-Chamiolo *et al.*, 2014).

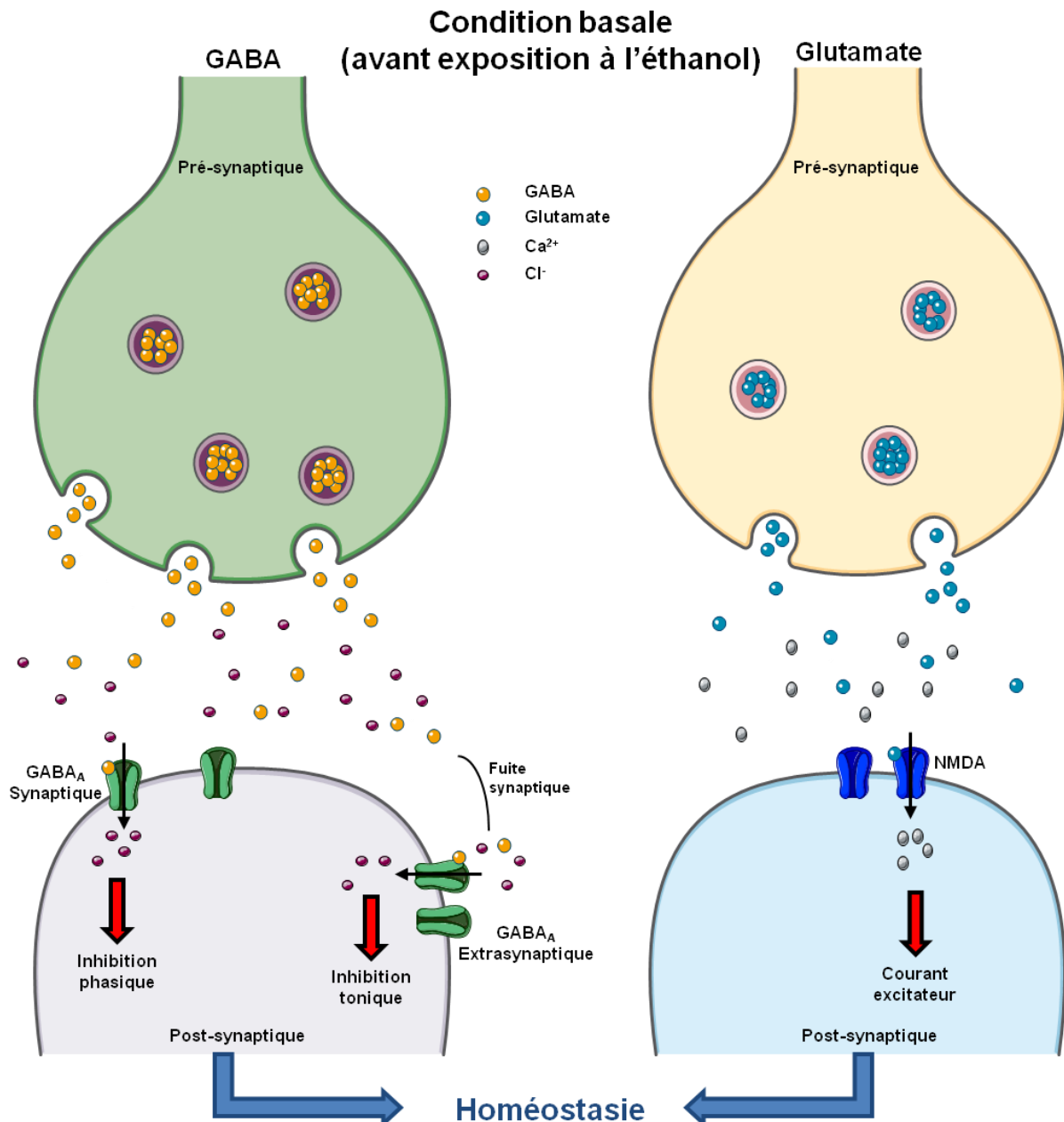


Figure 1. Schéma récapitulant les neurotransmissions GABAergique et glutamatergique. Pour des raisons de simplification, ne sont représentés ici que les récepteurs GABA_A et NMDA.

Gauche : le GABA se fixe sur les GABA_AR synaptiques créant un changement conformationnel du récepteur permettant l'entrée de Cl⁻ responsable de l'inhibition phasique. L'échappement du GABA de la fente synaptique abouti à l'activation des GABA_AR extrasynaptiques responsables de l'inhibition tonique.

Droite : le glutamate se fixe sur les récepteurs NMDA, permettant l'entrée de Ca²⁺ participant ainsi au courant excitateur. En condition basale (physiologique) ces deux neurotransmissions sont à l'équilibre permettant une homéostasie du système.

Les récepteurs AMPA (AMPA) sont couplés à des canaux ioniques qui deviennent perméables aux ions sodium suite à la fixation du glutamate sur ces récepteurs. L'entrée de sodium conduit à une dépolarisation locale qui permet le déplacement des ions magnésium bloquant le canal des récepteurs NMDA (NMDAR). La fixation du glutamate sur les NMDAR ainsi que le retrait des ions magnésium aboutit à une entrée massive de calcium qui participe à la formation du courant exciteur (Figure 1). Il existe de nombreuses combinaisons possibles de sous-unités pour composer les NMDARs : généralement les sous-unités GluN1 sont associées avec des sous-unités GluN2 et les NMDARs sont appelés di-hétéromériques, mais ils peuvent être composés d'un mélange de sous-unités GluN2 et GluN3, et sont alors appelés tri-hétéromériques (Paoletti *et al.*, 2013) (Figure 2).

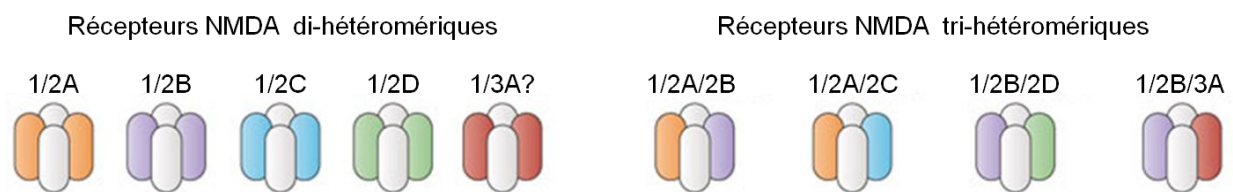


Figure 2. Représentation schématique de la composition des récepteurs NMDA di-hétéromériques et tri-hétéromériques (Adaptée de Paoletti *et al.*, 2013).

L'éthanol inhibe le fonctionnement de ces récepteurs en se liant sur les domaines transmembranaires des sous-unités GluN1 et GluN2 ou au niveau de la partie carboxyl-terminale de la sous-unité GluN1 (Wills and Winder, 2013). Des études ont rapportées que certaines sous-unités comme la GluN2B seraient plus sensibles à l'éthanol que d'autres (Wills *et al.*, 2012). L'inhibition des NMDARs par l'éthanol se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs, et c'est cette adaptation qui serait alors responsable des symptômes de sevrage observés lors de l'arrêt d'une consommation chronique d'éthanol, symptômes liés à une augmentation de la transmission glutamatergique et donc à une hyperexcitabilité (Nagy *et al.*, 2004). Les différents mécanismes responsables de ces effets induits par la prise d'alcool ou son arrêt seront repris plus tard dans le manuscrit.

c - Les autres systèmes

Outre ces deux systèmes majeurs de la neurotransmission centrale, l'éthanol étend son action sur un grand nombre de neurotransmetteurs ou de neuromodulateurs. Parmi eux, les systèmes monoaminergiques constituent une cible directe ou indirecte privilégiée de l'alcool.

La dopamine, neurotransmetteur du circuit de la récompense composé des structures mésocorticolimbiques, est considérablement affectée par l'éthanol, comme par l'ensemble des drogues d'abus. Une forte augmentation des concentrations de dopamine est observée après la consommation d'alcool, conséquence d'une facilitation de la libération de cette monoamine (Zapata *et al.*, 2006 ; Yim and Gonzales, 2000). L'arrêt de consommation d'alcool après sa prise chronique conduit à une diminution de la neurotransmission dopaminergique, ce qui participerait au développement des symptômes de sevrage et à la rechute (Melis *et al.*, 2005 ; Volkow *et al.*, 2007).

La libération de dopamine est en partie régulée par les endocannabinoïdes. La consommation d'alcool provoque vraisemblablement une diminution de l'expression de leurs récepteurs CB1 (Ortiz *et al.*, 2004) ce qui entrainerait une augmentation extracellulaire des endocannabinoïdes (Basavarajappa *et al.*, 2003) responsables d'une augmentation de libération de dopamine.

En amont de la dopamine, l'importance des systèmes sérotoninergique et noradrénergique a été récemment soulignée comme ayant un rôle majeur lors de la prise des drogues d'abus. L'activité de ces systèmes serait couplée dans les conditions basales (Salomon *et al.*, 2006) et l'injection de drogue d'abus pourrait alors induire un découplage de ces systèmes, ce qui conduirait à la mise en place de la dépendance (Lanteri *et al.*, 2008 ; Tassin, 2008). Les niveaux extracellulaires de noradrénaline dans le cortex préfrontal ont été corrélés avec le développement et la maintenance de la sensibilisation aux drogues d'abus

(Salomon *et al.*, 2006) faisant de ce neuromédiateur une cible générale de l'action des drogues.

Par ailleurs, il existe une relation inverse entre le tonus sérotoninergique et la consommation d'alcool. En effet, une hypoactivité de la transmission sérotoninergique est corrélée à une alcoolo-préférence et l'augmentation de cette neurotransmission limite la consommation d'alcool (LeMarquand *et al.*, 1994 ; Kelai *et al.*, 2003). De plus, l'étude post-mortem d'alcooliques présentant ou non le syndrome de Korsakoff, a révélé une réduction globale des neurones sérotoninergiques (Halliday *et al.*, 1993).

Le système opioïde intervient également dans la régulation de la consommation d'alcool. En effet, le blocage de récepteurs des opioïdes diminue la prise d'alcool volontaire chez le rongeur mais aussi chez l'homme, en corrélation avec une diminution des taux extracellulaires de dopamine (Job *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2005 ; O'Malley *et al.*, 1992 ; Volpicelli *et al.*, 1992).

L'ensemble de ces données montre que l'alcool n'a pas une, mais une multitude de cibles. De ce fait, l'étude du mode d'action de l'alcool et de ses conséquences s'avère difficile. Néanmoins, dans la partie suivante, nous nous efforcerons d'expliquer les différents mécanismes neurobiologiques qui se succèdent de la simple prise aiguë d'alcool jusqu'au développement de l'alcoolo-dépendance.

2 – De la simple prise d'alcool à l'addiction

Le comportement addictif est la résultante (1) de réponses liées à l'exposition à l'alcool, (2) de la génétique individuelle ainsi que (3) de l'environnement. Dans un premier temps nous aborderons les perturbations induites par la prise aiguë, puis par la prise chronique et enfin celles responsables des symptômes de sevrage et de la rechute. Nous parlerons

uniquement des systèmes GABAergique et glutamatergique, car nous avons vu précédemment que ces deux systèmes constituaient la cible privilégiée (bien que non exclusive) de l'éthanol.

a – La prise aiguë d'éthanol

Des études *in vitro* effectuées sur des tranches d'hippocampe ont démontré que l'éthanol pouvait exercer son action sur le système GABAergique à la fois au niveau pré- et post-synaptique (Ming *et al.*, 2006 ; Ariwola and Weiner, 2004). Ainsi, l'éthanol induit une augmentation de la libération de GABA dans la fente synaptique et potentialise l'activité des récepteurs GABA_A post-synaptiques. De plus, l'action de l'éthanol s'effectue sur les localisations synaptique et extrasynaptique des récepteurs GABA_A et dépend de sa concentration. Alors que de faibles concentrations induisent préférentiellement une potentialisation de l'inhibition tonique, de fortes concentrations provoquent une potentialisation des inhibitions tonique et phasique (Kumar *et al.*, 2009) (Figure 3).

L'application d'éthanol sur une tranche d'hippocampe augmente la fréquence spontanée et l'amplitude des courants inhibiteurs post-synaptiques (IPSCs) enregistrés au niveau de la sous-région CA1 de l'hippocampe, indiquant que l'éthanol active les récepteurs GABA et stimule la libération de GABA (Carta *et al.*, 2003 ; Sanna *et al.*, 2004). Ces mécanismes observés dans l'hippocampe sont également retrouvés dans d'autres structures cérébrales comme le noyau accumbens (Nie *et al.*, 2000), le striatum (Crowder *et al.*, 2006) ou encore l'amygdale (Roberto *et al.*, 2003). Cette potentialisation de la neurotransmission GABAergique, donc de l'inhibition, est en partie responsable de l'effet sédatif de l'éthanol (Figure 3).

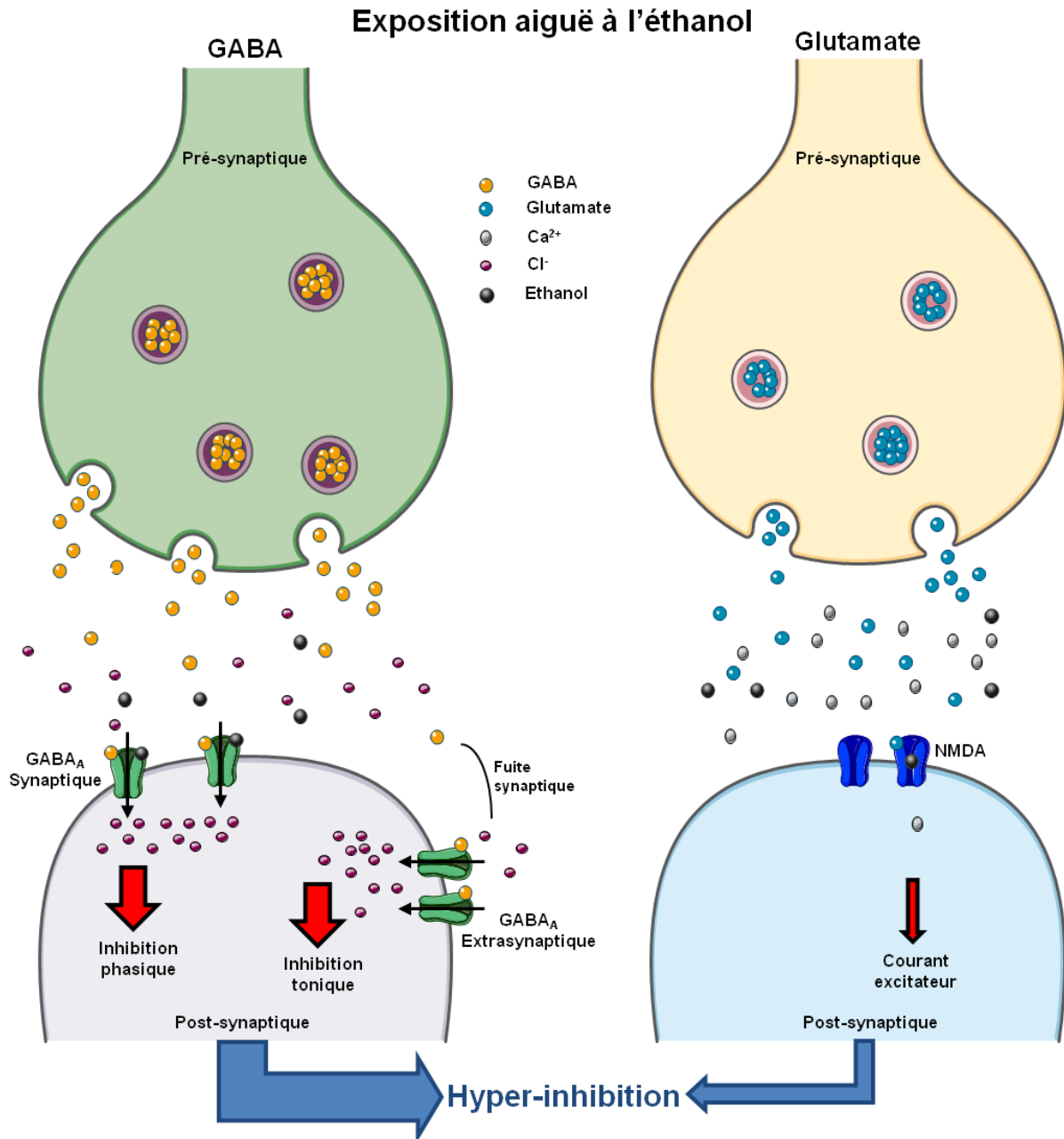


Figure 3. Schéma récapitulant les neurotransmissions GABAergique et glutamatergique lors de prise aiguë d'éthanol. Pour des raisons de simplification, ne sont représentés ici que les récepteurs $GABA_A$ et NMDA.

Gauche : l'éthanol induit une augmentation de libération de GABA au niveau pré-synaptique. De plus, le GABA et l'éthanol se fixent sur les $GABA_A$ R synaptiques. Ces deux phénomènes aboutissent à une potentialisation de l'inhibition.

Droite : l'éthanol inhibe les NMDAR et induit une diminution d'entrée de Ca^{2+} conduisant à une inhibition du courant exciteur. L'effet cumulé de ces deux neurotransmissions provoque une hyper-inhibition du système responsable en partie de l'effet sédatif de la prise aiguë d'alcool.

A l'inverse des récepteurs GABAergiques, l'activité des récepteurs glutamatergiques est inhibée par l'éthanol. Parmi les GluR, les NMDAR sont plus sensibles à l'éthanol que les

AMPA. La prise aiguë d'éthanol induit une inhibition des NMDAR dans des tranches d'hippocampe de rats adultes et cette inhibition est réversible (Lovinger *et al.*, 1990) (Figure 3). Le mécanisme d'inhibition des récepteurs NMDA par l'éthanol n'est pas exactement connu et plusieurs hypothèses sont avancées pour l'expliquer. La première concerne une fixation de la molécule d'éthanol au niveau des domaines transmembranaires du canal formé par les différentes sous-unités composant le récepteur (Smothers *et al.*, 2006). Une étude récente propose un rôle de la partie N-terminal du récepteur NMDA dans son inhibition par l'éthanol (Smothers *et al.*, 2013) mais d'autres avancent un rôle intracellulaire de l'éthanol sur l'activité de la calmoduline, protéine qui diminue l'activité du NDMAR lors d'une augmentation du calcium intracellulaire (Anders *et al.*, 2000 ; Krupp *et al.*, 1999).

Le blocage des courants excitateurs du glutamate et la potentialisation des effets inhibiteurs du GABA provoquent des modifications dans la plasticité synaptique, notamment dans l'hippocampe. Alors que certains travaux ne reportent pas de modification de la potentialisation à long-terme (LTP) (Fujii *et al.*, 2008 ; Izumi *et al.*, 2007), d'autres montrent une diminution après une exposition aiguë d'éthanol sur des tranches d'hippocampe (Fujii *et al.*, 2008 ; Tokuda *et al.*, 2011). A l'inverse, la dépression à long-terme (LTD) semble être augmentée dans l'hippocampe après l'exposition aiguë (Hendricson *et al.*, 2002). Il faut noter que ces effets sur la plasticité synaptique semblent dépendre de la concentration d'éthanol appliquée sur les tranches d'hippocampe ainsi que l'âge des animaux.

Les modifications des neurotransmissions aboutissent à une hyper-inhibition du système qui est responsable de l'effet sédatif de l'alcool en prise aiguë. Chez l'animal, cet effet de l'éthanol peut être observé par la perte du réflexe de redressement. Certaines sous-unités du GABA_AR seraient impliquées dans cet effet comportemental de l'éthanol, comme les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 2$ (Boehm *et al.*, 2004 ; Blednov *et al.*, 2003). De plus, la préférence à l'éthanol et sa consommation seraient en partie contrôlées par les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 4$ (Rewal

et al., 2009 ; June *et al.*, 2007) conduisant probablement à un maintien de la consommation d'alcool en dépit de l'effet négatif de celle-ci.

b – Maintien de la consommation d'alcool et neuroadaptation

Nous venons de voir qu'une exposition ou consommation aiguë d'éthanol induisait d'une part une augmentation de la neurotransmission inhibitrice contrôlée par les GABA_AR et d'autre part une diminution de la neurotransmission excitatrice par l'inhibition des NMDAR. La prise chronique et prolongée d'éthanol induit le développement d'une tolérance à ces effets sédatifs ou moteurs qui peuvent induire des atteintes cognitives (Le *et al.*, 1986 ; Silvers *et al.*, 2003). La période de sevrage qui suit une période de consommation chronique et prolongée d'alcool est marquée par une hyperexcitabilité du SNC responsable d'un état anxieux, de perturbations du sommeil ou encore une hyperalgésie. Les changements comportementaux observés à l'arrêt de la consommation d'éthanol sont responsables du maintien de la consommation, afin de conserver un état psychique et physique apparemment « normal », contribuant ainsi au développement de la dépendance.

Ces différentes conséquences proviennent entre autres des modifications de la composition et de la localisation des récepteurs GABA_A. La consommation chronique d'éthanol altère l'expression des différentes sous-unités du récepteur mais ces modifications d'expression ne sont pas homogènes au sein du SNC. Par exemple, la consommation chronique d'éthanol induit une augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ dans le cortex et l'hypothalamus, mais sa diminution dans l'amygdale et le noyau accumbens sans modification dans l'hippocampe ou l'aire tegmentale ventrale (Devaud *et al.*, 1997 ; Papadeas *et al.*, 2001 ; Matthews *et al.*, 1998). Cependant, une exposition à l'éthanol plus longue ainsi que des périodes d'abstinence forcées vont induire une augmentation de l'expression de $\alpha 4$ dans l'hippocampe (Matthews *et al.*, 1998). L'augmentation de la sous-unité $\alpha 4$ est

responsable de la diminution des courants inhibiteurs enregistrés dans la région CA1 de l'hippocampe lors d'exposition chronique à l'éthanol (Hsu *et al.*, 2003). De plus, une consommation chronique d'éthanol provoque le déplacement préférentiel de la sous-unité $\alpha 4$ d'une localisation extra-synaptique vers une localisation synaptique sur les cellules du gyrus denté de l'hippocampe (Liang *et al.*, 2006) (Figure 4). Cette altération de composition du récepteur induit des modifications dans le trafic et le recyclage des GABA_AR. La consommation chronique d'alcool induit une augmentation de l'internalisation des GABA_AR contenant la sous-unité $\alpha 1$ et une augmentation membranaire de ceux contenant la sous-unité $\alpha 4$ (Kumar *et al.*, 2003). Or l'augmentation de l'expression de la sous-unité $\alpha 4$ produit une association plus forte de la protéine kinase C (PKC) dans l'hippocampe. Cette protéine kinase phosphoryle le GABA_AR et empêche sa reconnaissance par la protéine AP-2 qui dirige son internalisation. L'augmentation de son interaction avec la PKC conduit donc à une augmentation de la phosphorylation du récepteur et ainsi à la diminution de son endocytose (Kumar *et al.*, 2002 ; Kitler *et al.*, 2005 ; Kitler *et al.*, 2008) (Figure 4). Les changements dans la composition des récepteurs GABA_A, des localisations préférentielles et de ses interactions avec les protéines intracellulaires font état d'une adaptation à l'exposition chronique à l'éthanol et sont donc, en partie, responsables des modifications comportementales observées lors de consommations prolongées d'éthanol et du sevrage.

En plus de modifications du système GABAergique, le système glutamatergique et les interactions entre ces deux systèmes sont perturbés. La consommation chronique d'éthanol conduit à une augmentation du nombre de récepteurs NMDA à la membrane ainsi qu'à une augmentation d'affinité du récepteur pour ses ligands. Ces modifications induites par l'éthanol sont une réponse adaptative afin de compenser l'inhibition de la neurotransmission glutamatergique induite par l'éthanol (Figure 4). De plus, comme les récepteurs GABA, l'expression des sous-unités des récepteurs NMDA sera modifiée par la prise chronique

d'éthanol. Ainsi, une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B et une diminution de GluN2A sont observées après une exposition prolongée à l'éthanol (Meinhardt *et al.*, 2013). Cette augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B est également accompagnée par une réduction de l'endocytose des récepteurs et donc de l'expression membranaire du récepteur (Qiang *et al.*, 2007 ; Kroener *et al.*, 2012) (Figure 4).

Ces modulations de la neurotransmission GABAergique et glutamatergique exercées par l'éthanol conduisent à des altérations de la plasticité synaptique, responsables en partie des modifications comportementales provoquées par l'alcool (Zorumski *et al.*, 2014). Une réduction de la LTP dans l'hippocampe a été associée à des altérations de la mémoire spatiale (Peris *et al.*, 1997 ; Roberto *et al.*, 2002). La LTD a été peu étudiée après une exposition à long terme à l'éthanol, cependant il a été rapporté une diminution de celle-ci dans l'hippocampe de rat après un tel traitement (Tinschmidt *et al.*, 2003).

En résumé, la consommation chronique d'éthanol induit une surrégulation des récepteurs NMDAR et une diminution fonctionnelle des récepteurs GABA provoquées par les modifications de leurs sous-unités. Les deux systèmes sont en interaction et jouent un rôle important dans l'adaptation des récepteurs après la prise chronique d'éthanol. En effet, le blocage des récepteurs NMDA augmente l'expression membranaire des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité $\alpha 4$, notamment au niveau de l'hippocampe (Matthews *et al.*, 2000). Cette dernière donnée suggère que, dans le cadre de la consommation d'alcool, le blocage de la neurotransmission glutamatergique pourrait entraîner une stimulation de l'expression des récepteurs GABA_A permettant le renforcement des effets de l'éthanol sur la neurotransmission GABAergique, ce qui participerait aux mécanismes de tolérance.

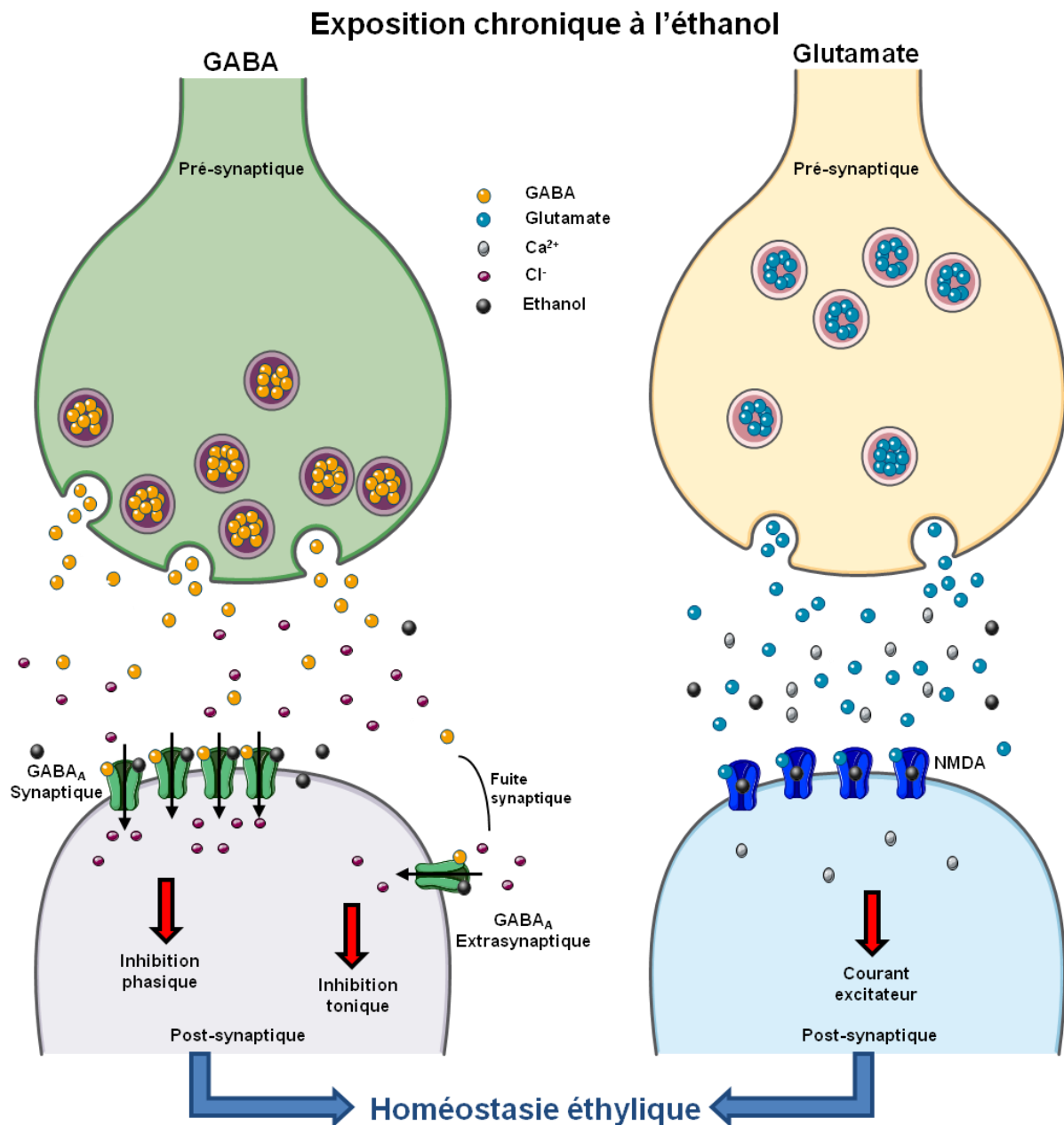


Figure 4. Schéma récapitulant les neurotransmissions GABAergique et glutamatergique lors de prise chronique d'éthanol. Pour des raisons de simplification, ne sont représentés ici que les récepteurs GABA_A et NMDA.

Gauche : l'éthanol en prise chronique induit une diminution de la fonctionnalité des récepteurs GABA_A due à des modifications des sous-unités les composant.

Droite : l'éthanol en prise chronique induit un changement dans la composition des récepteurs NMDA conduisant à une augmentation du nombre de récepteurs à la membrane. Lors de la consommation d'alcool dans une période de prise chronique, le système est à l'équilibre entre inhibition et excitation grâce aux modifications d'expression et de localisation des récepteurs, c'est une sorte d'homéostasie « éthylique ».

c – La recherche compulsive, le sevrage et la rechute

Les changements adaptatifs induits par la prise chronique et prolongée d'éthanol sur les systèmes GABAergique et glutamatergique induisent une hyperexcitabilité du système nerveux central lors de l'arrêt de la consommation. Cette hyperexcitabilité conduit dans certains cas à une rechute, donc à une nouvelle consommation d'éthanol, voire à une consommation majorée.

L'hyperexcitabilité du système nerveux central pendant la phase de sevrage suite à une prise chronique d'éthanol est caractérisée au niveau comportemental par un risque accru de rechute, une augmentation de l'anxiété, une hyperalgésie ou encore des perturbations du sommeil. L'arrêt de la consommation diminue la neurotransmission inhibitrice GABAergique au bénéfice de celle excitatrice du glutamate ce qui conduit à une hyperexcitabilité généralisée (Figure 5). La modulation positive de la transmission GABAergique semble constituer une cible pharmacologique pour compenser l'absence d'éthanol et ainsi éviter les symptômes de sevrage. Des traitements pharmacologiques ciblant les récepteurs GABA_A, ou certaines sous-unités du récepteur, permettent en effet de prévenir les effets induits par le sevrage. Par exemple, le diazépam ou le lorazepam, benzodiazépines, qui, par leur site de fixation dans le canal GABA_A modulent positivement l'action du GABA, réduisent l'hyperalgésie chez le rat (Gatch, 1999) et induisent la réduction des convulsions liées au sevrage chez la souris (Becker and Veatch, 2002). Le baclofène, agoniste des récepteur GABA_B réduit la motivation pour consommer de l'alcool chez le rongeur mais également chez l'homme, bien que cet effet soit encore controversé (Maccioni *et al.*, 2012 ; Addolorato *et al.*, 2011). L'utilisation d'animaux modifiés génétiquement pour certaines sous-unités des récepteurs GABA_A, comme par exemple la sous-unité $\alpha 1$ a permis de montrer que la composition des récepteurs influait sur la sensibilité à l'éthanol mais également sur la sévérité des symptômes relatifs au sevrage. Les souris invalidées pour la sous-unité $\alpha 1$ présentent une diminution de la consommation

d'éthanol sans modification des convulsions liées au sevrage (Blednov *et al.*, 2003). D'autre part, l'augmentation de l'expression de $\alpha 1$ est observée après une exposition chronique à l'éthanol chez la souris. L'insensibilité de la sous-unité $\alpha 1$ pour l'éthanol conduit à un accroissement des convulsions, associé à une mortalité plus élevée liée à des crises de sevrage plus sévères (Werner *et al.*, 2009). De même, l'invalidation du gène codant la sous-unité $\beta 2$ induit une augmentation des convulsions (Blednov *et al.*, 2003). Ces données impliquent directement ces sous-unités dans le mécanisme de tolérance induit par l'éthanol.

L'hyperexcitabilité du système nerveux liée à une levée de l'inhibition des récepteurs glutamatergiques par l'absence d'éthanol semble être la cause de l'envie irrésistible de consommer de l'alcool, ou « craving » (Gass and Olive, 2008) (Figure 5). Des études pharmacologiques ont montré que l'utilisation d'un bloqueur du canal des récepteurs NMDA le MK-801, pouvait potentialiser les effets sédatifs et locomoteur de l'exposition à l'éthanol (Chen and Holmes, 2009 ; Palachick *et al.*, 2008). Il a également été observé que ce composé pouvait réduire l'auto-administration d'éthanol (Bakstorm and Hyytia, 2006 ; Rassnick *et al.*, 1992), les augmentations de la consommation d'éthanol produites par des périodes d'abstinence forcées (Vengeliene *et al.*, 2005) et la prise d'éthanol volontaire (Malpass *et al.*, 2010). L'utilisation de composés visant à supprimer l'hyperexcitabilité du système nerveux permet d'une part de réduire la sévérité des symptômes de sevrage et d'autre part de décourager la consommation d'éthanol en augmentant les effets subjectifs de l'intoxication à l'éthanol (Krystal *et al.*, 2003).

Un des problèmes majeurs de la période d'abstinence qui suit une période de consommation chronique est la prévention de la rechute. Dans les modèles animaux, cette rechute est caractérisée par une augmentation transitoire de la quantité d'éthanol consommée lorsque l'éthanol est à nouveau proposé aux animaux après une période d'abstinence forcée.

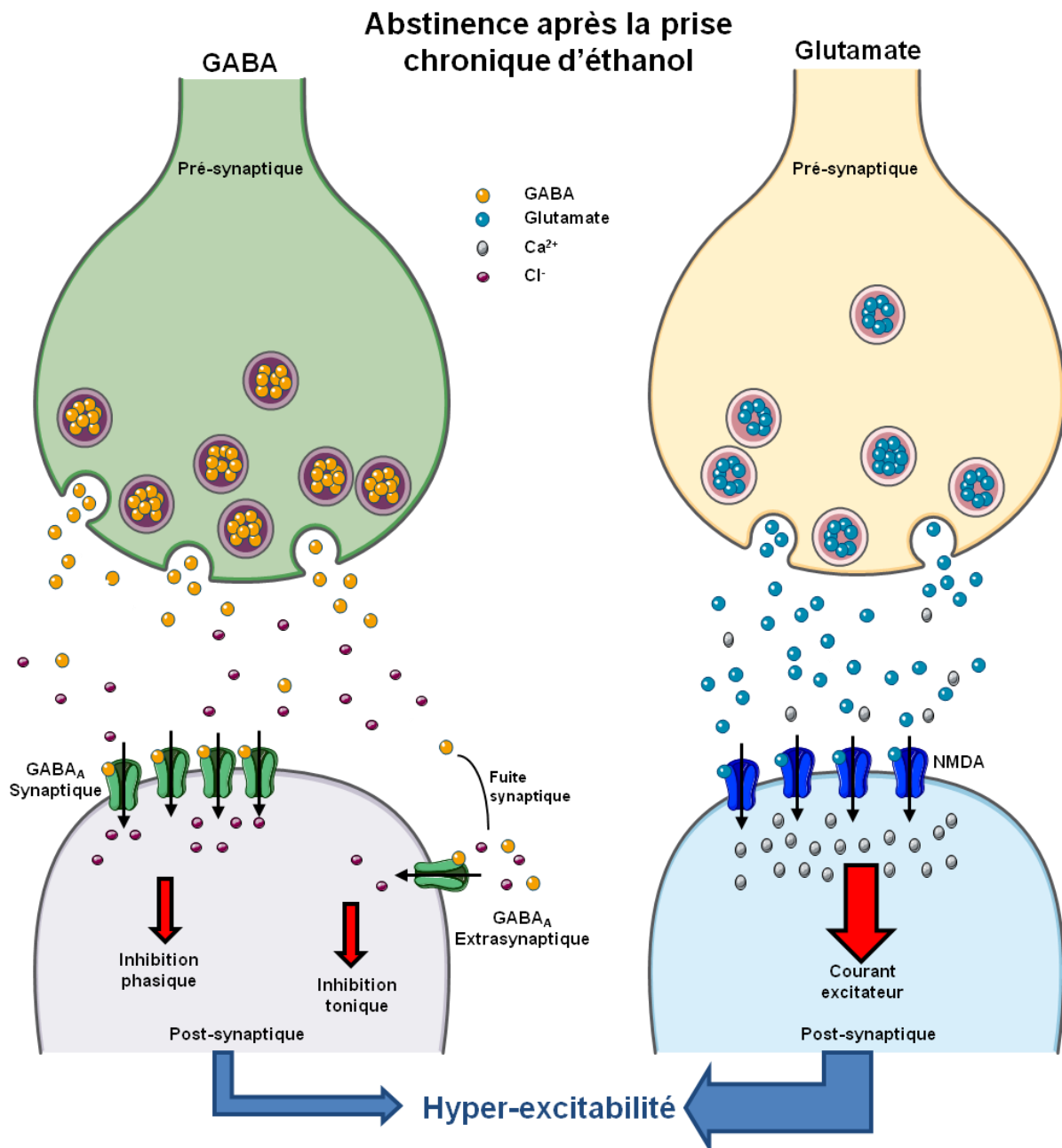


Figure 5. Schéma récapitulant les neurotransmissions GABAergique et glutamatergique lors de l'abstinence après une prise chronique d'éthanol. Pour des raisons de simplification, ne sont représentés ici que les récepteurs GABA_A et NMDA.

Gauche : l'arrêt de la consommation d'éthanol induit une diminution de la neurotransmission GABA comparée à celle pendant la prise d'éthanol.

Droite : la levée de l'inhibition exercée par l'éthanol induit un accroissement de la neurotransmission glutamatergique due à une augmentation du nombre de récepteurs présents à la membrane. L'abstinence à partir d'une consommation chronique et prolongée conduit à une hyperexcitabilité responsable des symptômes de sevrage et de la recherche compulsive ainsi que de la rechute qui s'en suit.

L'hyperexcitabilité du système glutamatergique est fortement impliquée dans la rechute (Gass and Olive, 2008). Les composés capables de réduire l'hyperexcitabilité glutamatergique en

ciblant les récepteurs ionotropiques NMDA sont efficaces dans des modèles animaux de rechute (Vengliene *et al.*, 2005 ; Hötler *et al.*, 2000). Le récepteur AMPA est également impliqué dans ce processus puisque l'utilisation d'antagonistes spécifiques ou l'invalidation d'une de ses sous-unités, permet de réduire la consommation d'éthanol lors de phase de rechute (Cowen *et al.*, 2003 ; Sanchis-Segura *et al.*, 2006). Le blocage des récepteurs métabotropiques par des antagonistes diminue la prise d'éthanol lors de la rechute (Bäckström *et al.*, 2004 ; Rodd *et al.*, 2006). Comme évoqué précédemment, les agonistes GABAergiques comme le diazepam ou le baclofène ciblant respectivement les récepteurs GABA_A et GABA_B sont également efficaces pour diminuer la consommation d'éthanol dans des modèles de rechute après une période d'abstinence (Schmitt *et al.*, 2002 ; Colombo *et al.*, 2006).

D – Les facteurs de risques et de susceptibilité

Comme mentionné au début de ce chapitre, les effets de la consommation excessive d'éthanol résultent de l'exposition à l'alcool associée à la génétique individuelle et à l'environnement.

1 – L'environnement

Dans l'environnement quotidien, de multiples sources de stress lié à des conditions de travail ou familiales ou encore à des événements de vie (chômage, échec, divorce, agression, décès, etc.) peuvent interférer avec l'homéostasie de l'individu. Toute situation stressante provoque l'activation générale du système de réponse au stress. Ce système, constitué par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), permet d'activer certaines fonctions physiologiques suite à l'augmentation du cortisol circulant pour permettre de faire face à l'élément stressant. Il a été montré, chez le rongeur comme chez l'homme, que la consommation chronique d'alcool induisait une augmentation de l'activité de l'axe HPA et

des niveaux de glucocorticoïdes circulants (Wand and Dobs, 1991). A l'inverse, un niveau élevé de glucocorticoïdes contribuerait à amplifier la motivation à boire (Piazza and Le Moal, 1997) et d'ailleurs, l'administration de corticostérone chez le rongeur augmente sa consommation d'alcool (Fahlke *et al.*, 1995 : Fahlke *et al.*, 1996) alors que celle d'un antagoniste des récepteurs des glucocorticoïdes réduit l'auto-administration d'alcool (Koenig and Olive, 2004). Ces données suggèrent que le niveau en glucocorticoïdes pourrait être directement lié à la motivation pour boire. Suite à une période prolongée de consommation d'alcool, la période de sevrage se caractérise par l'élévation de la concentration en glucocorticoïdes dans certaines structures cérébrales comme l'hippocampe et le cortex préfrontal (Little *et al.*, 2008). Ces concentrations élevées en glucocorticoïdes, corrélées à une atrophie de l'hippocampe dans certaines pathologies psychiatriques, pourraient être responsables d'une perte neuronale, notamment au niveau de l'hippocampe (Rose *et al.*, 2010 ; Sapolsky, 2000), observée lors d'alcoolisations chroniques.

En plus du stress, d'autres facteurs peuvent influencer ou renforcer la consommation d'alcool. Par exemple, l'exposition précoce (adolescence) à l'éthanol induit une augmentation de la consommation spontanée d'alcool à l'âge adulte chez les souris de la lignée DBA/2J (Molet *et al.*, 2012). En revanche, la consommation chronique de sucre pendant la période de l'adolescence chez le rat réduit la consommation d'éthanol à l'âge adulte (Vendruscolo *et al.*, 2010), probablement par un renforcement du système de la récompense envers le sucre plutôt que vers l'alcool.

2 – La génétique

Des études comparatives d'enfants adoptés ont pu distinguer les parts environnementale et génétique de susceptibilité pour développer une alcoolo-dépendance. Ces études ont montré que ce risque était significativement plus élevé chez des enfants adoptés

dont les parents biologiques avaient développé une alcoolo-dépendance, que chez des enfants adoptés dont les parents biologiques n'avaient pas de problème d'alcool (Goodwin *et al.*, 1973), reflétant ainsi l'influence de la génétique sur la susceptibilité à l'alcoolisme. Par ailleurs, les consommateurs réguliers d'alcool ne développent pas tous une alcoolo-dépendance, prouvant ainsi la susceptibilité génétique des effets de l'alcool. La variabilité génétique est probablement responsable de la prédisposition des individus à adopter des comportements addictifs et à présenter des réponses différentes aux effets de l'alcool. Néanmoins, l'influence environnementale que nous avons évoquée précédemment exerce son rôle en interaction avec ces facteurs génétiques, et c'est cette interaction qui est probablement responsable du développement de l'addiction.

Parmi les nombreux facteurs génétiques qui ont pu être associés à la réponse à l'alcool, les enzymes du métabolisme de l'éthanol ont une place majeure (Edenberg, 2007). L'éthanol est métabolisé par une enzyme hépatique, l'alcool déshydrogénase (ADH), produisant l'acétaldéhyde, métabolite toxique, ensuite converti en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale ALDH2. Près de la moitié de la population asiatique est porteur de l'allèle ALDH2*2 qui encode une forme inactive de l'enzyme ALDH. Suite à la consommation d'une faible quantité d'alcool, les porteurs de cet allèle présentent le syndrome de « Asian Flush », correspondant à un rougissement facial important associé avec des maux de têtes et des nausées, qui est la conséquence d'une accumulation d'acétaldéhyde. Ce syndrome est néanmoins protecteur des fortes consommations d'alcool et par conséquent de l'alcoolo-dépendance (Higuchi *et al.*, 2004).

Un certain nombre de polymorphismes des gènes codant les récepteurs des neurotransmetteurs interviennent dans la modulation des réponses à l'alcool. Parmi eux, les polymorphismes du récepteur GABA_A sont fortement associés à la consommation d'alcool. Par exemple, le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP : single nucleotide polymorphism)

GABRA2 dans le gène encodant le récepteur GABA_A (Edenberg *et al.*, 2004) a été relié à l'alcool-dépendance et semble être un bon marqueur du développement tardif de l'alcoolisme (Dick *et al.*, 2006). Il a également été montré que le SNP GABRG3 serait impliqué dans le risque de développer une alcool-dépendance (Dick *et al.*, 2004).

Les autres systèmes (dopaminergique, sérotoninergique) ont également été impliqués dans le risque de développer une alcool-dépendance et dans l'addiction. Par exemple, le transporteur sérotoninergique (5-HTT) a été relié non seulement à l'alcool-dépendance mais également dans le comportement de rechute (Pinto *et al.*, 2008 ; Gorwood *et al.*, 2004). Le polymorphisme du récepteur de la dopamine DRD1 a été associé à des comportements alcool-dépendants et la recherche de nouvelles sensations (Limosin *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007 ; Batel *et al.*, 2008). Bien d'autres polymorphismes ont été associés soit au développement de l'alcool-dépendance, soit à un risque accru de la développer, soit aux phénomènes de rechute (Köhnke, 2008 ; Rietschel and Treutlein, 2013).

3 – L'épigénétique

Nous venons de voir que certaines variabilités génétiques pouvaient prédisposer un individu à l'alcool-dépendance. Les informations hérissables sont transmises à la descendance par la séquence d'ADN et en cas de changement, donc de mutation, dans la séquence d'ADN, ce changement sera également transmis. Cependant, les mutations dans la séquence d'ADN ne sont pas influencées par les facteurs environnementaux sauf dans le cas de mutations induites par des mutagènes. L'héritage génétique est défini comme un processus de transfert des traits phénotypiques des parents aux enfants par le génome au travers des gamètes. Néanmoins, des travaux de plus en plus nombreux montrent que l'héritage de l'information génétique n'est pas le seul mécanisme par lequel la transmission trans-générationnelle des caractères s'opère, mais que l'épigénome est fortement impliqué et peut être modulé par des

facteurs environnementaux. Le terme épigénome, ou épigénétique, a été pour la première fois utilisé par Conrad Waddington en 1942 (Waddington, 2012) pour décrire les interactions gène-environnement amenant à un phénotype particulier dans un modèle développemental de la drosophile. Aujourd'hui, le terme épigénétique désigne toutes les modifications biochimiques qui ont lieu sur le génome ou autour du génome et qui ne modifient pas la séquence nucléotidique mais affectent la transcription génique. Ces mécanismes seront détaillés dans la partie suivante.

Les souris de la souche C57BL/6J présentent naturellement une préférence élevée pour l'éthanol comparée à des souris d'autres souches comme les DBA/2J (Belknap *et al.*, 1993 ; Meliska *et al.*, 1995). Des études de comparaison chez ces deux souches de souris ont montré d'une part que l'expression de certains peptides comme le neuropeptide Y (NPY), impliqué dans la régulation de la prise de nourriture et la prise d'alcool, était diminuée chez les C57BL/6J (Misra and Pandey, 2003) et que d'autre part l'expression de ce peptide était corrélée avec des modifications épigénétiques lors de l'exposition à l'éthanol (Pandey *et al.*, 2008). Ces données suggèrent fortement que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle dans le développement de l'alcool-dépendance, en contrôlant l'expression de protéines impliquées dans la prise d'alcool, ce que nous développerons dans le chapitre suivant.

II – EPIGENETIQUE

A – Définition

Le terme épigénétique définit l'ensemble des modifications biochimiques qui se produisent au niveau du génome et qui interviennent dans la régulation de la transcription génique sans modifier la séquence nucléotidique. Ces modifications, qui sont héréditaires et réversibles, se produisent soit au niveau de l'ADN lui-même mais sans en altérer sa séquence, soit au niveau des protéines appelées histones qui permettent l'organisation de l'ADN en collier de perles. L'ADN forme avec les histones la chromatine dont on distingue dans le noyau cellulaire deux états:

- l'euchromatine, qui correspond à un état dit décondensé de la chromatine, permissive à la transcription génique ;
- l'hétérochromatine, qui correspond à un état condensé de la chromatine dans laquelle la transcription génique est globalement inactive.

Ces deux états de la chromatine sont régis par les modifications post-traductionnelles des histones qui rendent la chromatine plus ou moins compacte et régulent ainsi la transcription génique. La méthylation de l'ADN fait également partie des régulations épigénétiques permettant des modifications transcriptionnelles et sera détaillée plus tard dans ce chapitre.

B - La chromatine et le nucléosome

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Un nucléosome est constitué d'un octamère d'histones sur lequel l'ADN est enroulé afin de le compacter. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 formant le cœur du nucléosome sont présentes en deux copies (Luger, 2006). La formation d'un nucléosome commence par l'hétérodimérisation des histones H3 et H4 pour former un tétramère auquel s'ajoutent ensuite deux dimères de H2A-H2B (Figure 6A).

L'ADN s'enroule 1,65 fois autour, ce qui correspond à la présence de 146 paires de bases (bp) autour de l'octomère. Les histones avec l'ADN forment le nucléosome, dont l'enroulement (en collier de perles) forme la chromatine. La région internucléosomique est caractérisée par l'ajout de l'histone H1 au niveau de l'ADN lieur qui sépare deux nucléosomes, permettant ainsi de stabiliser le nucléosome, et qui participe également à la compaction progressive de la chromatine (Figure 6B).

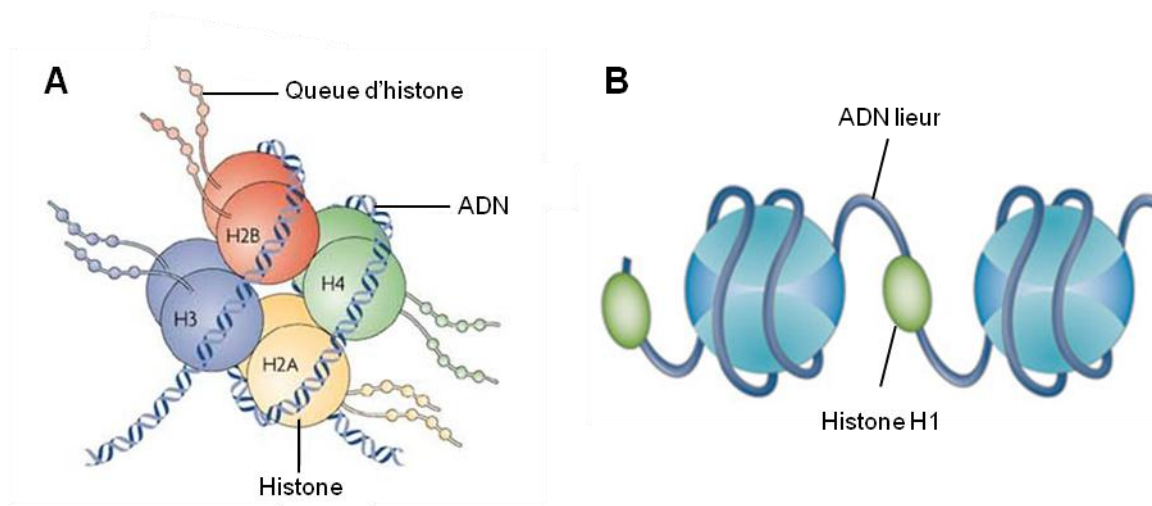


Figure 6. Schéma illustrant l'organisation d'un nucléosome. (A) Structure du nucléosome comprenant l'octamère d'histones, avec les queues des histones où ont lieu les modifications post-traductionnelles, et l'ADN enroulé autour de l'octamère. (B) Organisation d'un enchainement de deux nucléosomes avec l'ajout de l'histone H1 et la présence de l'ADN lieur entre les nucléosomes (Adaptée de Tsankova *et al.*, 2007 et Larkin *et al.*, 2012).

C – Les histones

Les histones sont des protéines chargées positivement par la présence en grande quantité de lysine et d'arginine. Les histones sont fixées à l'ADN par des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques entre les résidus phosphates de l'ADN et les charges positives des histones. Une histone est composée de deux régions principales :

- l'*histone-fold* qui permet la dimérisation des histones lors de la formation de l'octamère (Figure 7) ;

- la queue de l'histone où auront lieu les modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation de la transcription (Figure 7).

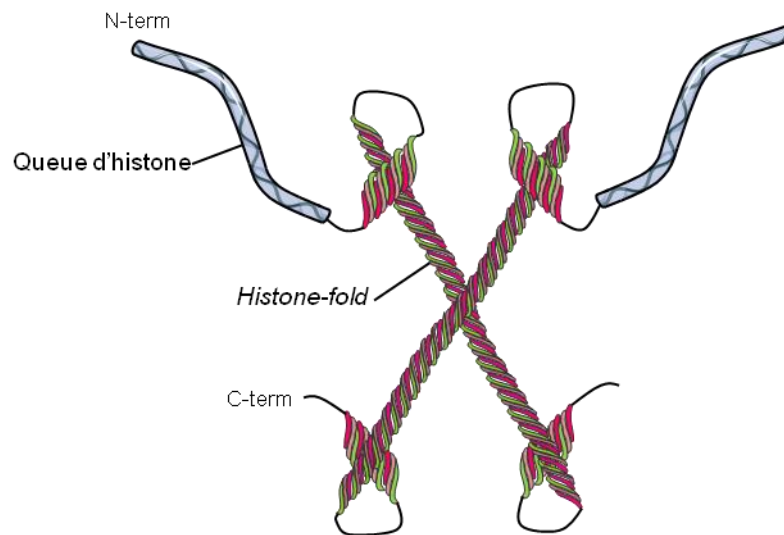


Figure 7. Illustration de la structure d'un dimère d'histones. Les deux histones sont reliées par la partie *histone-fold*. Les dimères d'histones s'assemblent ensuite pour former un octamère d'histones. Les résidus situés au niveau de la partie N-terminale, correspondant à la queue de l'histone, seront ensuite soumis à des modifications post-traductionnelles.

Les modifications post-traductionnelles (PTM) des résidus de la queue d'histone sont des modifications réversibles et dynamiques. Elles interviennent dans la régulation de la transcription en modifiant la conformation de la chromatine afin de la rendre plus ou moins permise à l'accrochage des facteurs de transcription ou des facteurs de répression.

D – Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être de plusieurs types : acétylation, méthylation, phosphorylation ou encore ubiquitination. Ces différentes modifications ont lieu sur la queue de l'histone et interviennent dans l'état d'activation ou de répression de la transcription génique par compaction ou relaxation de la chromatine. Nous détaillerons ici les modifications les plus étudiées sur les histones H3 et H4. Ces modifications sont le premier niveau de régulation épigénétique de la transcription et ont été démontrées comme jouant un rôle crucial durant le développement mais également dans

certaines pathologies comme le cancer ou l'addiction (Campbell and Tummino, 2014 ; Pena *et al.*, 2014).

1 – L'acétylation

L'ajout de groupement acétyle sur la queue des histones a été la première modification post-traductionnelle à être décrite comme étant liée à un état fonctionnellement actif de la chromatine (Pogo *et al.*, 1966 ; Hebes *et al.*, 1988). Inversement, il a été démontré par la suite qu'une chromatine hypoacétylée était liée à un état inactif de la chromatine ou transcriptionnellement silencieuse (Jeppesen and Turner, 1993).

L'acétylation de la queue des histones s'effectue sur les résidus lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3 et sur les lysines 5, 8, 12, et 16 de l'histone H4 (Strahl and Allis, 2000) (Figure 8). L'ajout de groupement acétyle sur les résidus lysines est effectué par des enzymes appelées histones acétyltransférases (HAT). Ces enzymes transfèrent un groupe acétyle de l'acétyl-CoA vers un groupement amine d'un résidu lysine de la queue de l'histone (Verdone *et al.*, 2005). Elles sont réparties en 5 familles et sont listées dans le tableau 1.

L'acétylation des histones est reliée à une chromatine transcriptionnellement active. L'ajout de groupements acétyles sur les résidus lysines des queues d'histones neutraliserait les charges positives de celle-ci et par conséquent diminuerait les capacités d'accrochage des histones à l'ADN induisant une augmentation de l'accessibilité des facteurs de transcriptions et des co-activateurs au niveau de la chromatine, conduisant ainsi à une activation de la transcription génique (Kingston and Narlikar, 1999). Une autre hypothèse est que l'ajout de groupement acétyle ferait apparaître un site de fixation pour des protéines impliquées dans la stimulation de la transcription et notamment les protéines à bromodomaine reconnaissant les lysines acétylées (Yang, 2004).

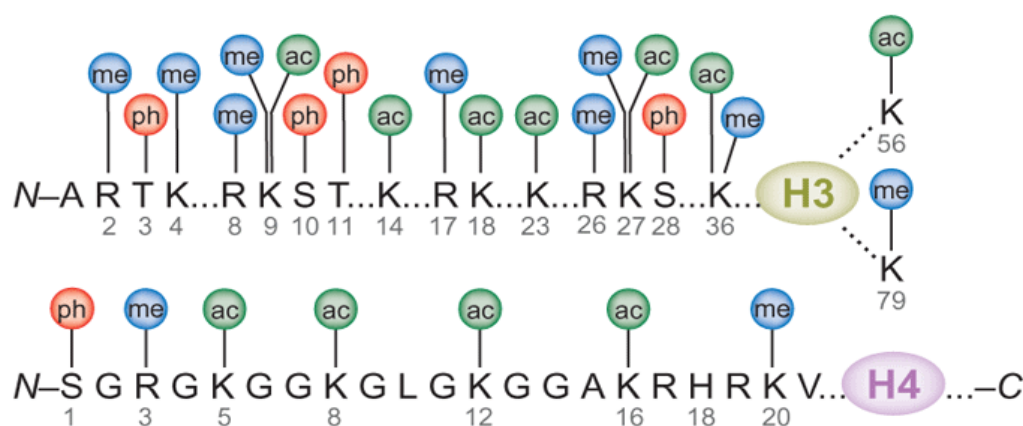


Figure 8. Modifications post-traductionnelles sur la queue des histones H3 et H4. ac, acétylation ; me, méthylation ; ph, phosphorylation (Adaptée de Bhaumik *et al.*, 2007).

Familles	Substrats (histones)
GNATs (Gcn5-related acetyltransferase)	
Hat1	H4
Gcn5 and Gcn5L	H3 K9/K14
Elp3	H3/H4
Hpa2	H3/H4
PCAF	H3/H4
MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60-related)	
Esa1	H4
Tip60	H4
MOF	H4 K16/H3
MOZ	
Sas3	H3/H4
Sas2	H4K16
P300/CBP	
P300/CBP	H3/H4
General transcription factor HATs	
TAF250	H3/H4
TFIIIC	H3/H4
Nuclear hormone related HATs	
SRC1	H3/H4
SRC3/ACTR	H3/H4

Tableau 1. Familles des histones acétyltransferases et les histones cibles associées. (Adapté de Adcock *et al.*, 2006).

L'acétylation est un phénomène réversible. La suppression des groupements acétyles sur la queue des histones est effectuée par les enzymes histone désacétylases (HDAC). Il existe quatre familles d'HDACs qui sont listées dans le tableau 2.

Famille d'HDACs	Substrats (histones)
Classe I	
HDAC 1	H3/H4
HDAC 2	H3/H4
HDAC 3	H3/H4
HDAC 8	H3/H4
Classe II	
HDAC 4	H3/H4
HDAC 5	H3/H4
HDAC 6	H3/H4
HDAC 7	H3/H4
HDAC 9	H3/H4
HDAC 10	H3/H4
Classe III	
SIRT 1	H3/H4; Protéines non-histone
SIRT 2	H3/H4; Protéines non-histone
SIRT 3	H4; Protéines non-histone
SIRT 4	Protéines non-histone
SIRT 5	H4; Protéines non-histone
SIRT 6	H3; Protéines non-histone
SIRT 7	Protéines non-histone
Classe IV	
HDAC 11	H3/H4

Tableau 2. Familles des histones déacétylases et les substrats associés.
(Adapté de Adcock *et al.*, 2006 ; Renthal and Nestler, 2009).

Les HDACs de classe I sont exprimées de façon ubiquitaire. Elles sont localisées exclusivement dans le noyau et agissent majoritairement en tant que répresseurs transcriptionnels en étant associées à un complexe répresseur.

Les enzymes de classe II sont à la fois nucléaires et cytoplasmiques. Il a été démontré dans l'hippocampe que suite à l'activation cellulaire provoquée par un influx calcique, les

enzymes HDAC4 et 5 sont exportées vers le noyau (Schlumm *et al.*, 2013). Cette translocation nucléaire suggère que cette classe d'HDAC serait impliquée dans le lien déjà établi entre activité synaptique et remodelage de la chromatine. L'enzyme HDAC6 a été mise en évidence dans le transport de vésicules cytoplasmiques et notamment les vésicules transportant le BDNF (Xu *et al.*, 2014), facteur neurotrophique dont nous reparlerons plus tard.

Les HDACs de classe III sont appelées sirtuines (SIRT). Les substrats de ces enzymes ne sont pas uniquement les histones. Elles peuvent désacétyler de nombreux facteurs de transcription, de co-régulateurs ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire et du programme apoptotique. La désacétylation par les sirtuines de ses substrats peut conduire à une répression mais également à une stimulation de l'activité (Renthal and Nestler, 2009).

Enfin, la dernière enzyme identifiée sur homologie de domaine avec les enzymes des classe I et II est la HDAC11 qui forme à elle seule la famille de classe IV. Cette enzyme possède un site catalytique histone désacétylase (Gao *et al.*, 2002), est majoritairement localisée dans le noyau au niveau du SNC et semble jouer un rôle prépondérant au cours du développement et dans la maturation neuronale (Liu *et al.*, 2008).

La désacétylation des histones par les HDACs conduit à une compaction de la chromatine et ainsi réprime la transcription. Cependant, les HDACs ne semblent pas se fixer directement à l'ADN mais nécessitent l'association à des partenaires protéiques pour ensuite désacétyler les histones. Les HDACs vont former un complexe répresseur de la transcription en établissant, par exemple, des interactions avec des protéines capables de s'accrocher à l'ADN méthylé (une autre modification épigénétique sur laquelle nous reviendrons plus tard). Les complexes répresseurs les plus étudiés font intervenir les HDACs 1 et 2. Ces deux enzymes sont retrouvées dans le complexe Sin3A, CoRest et NuRD (Figure 9).

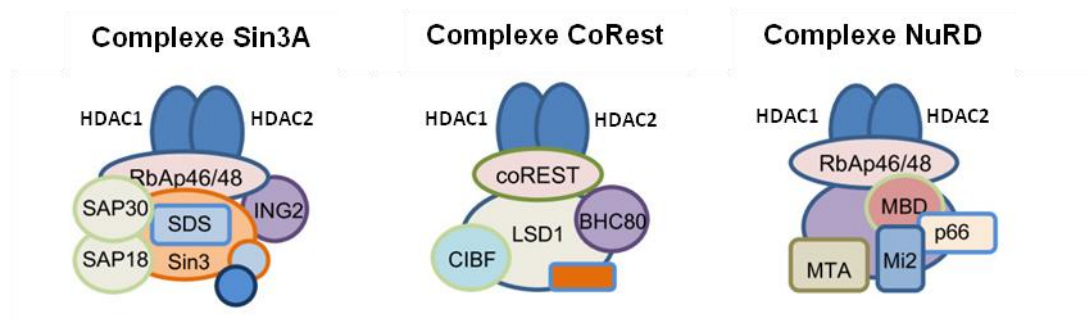


Figure 9. Composition des complexes répresseurs contenant les HDACs 1 et 2 (Adaptée de Delcuve *et al.*, 2012).

Le complexe Sin3A avec ses partenaires SAP30 et 18 ainsi que les protéines RbAp servent de plateforme pour l'ajout d'autres protéines enzymatiques comme les méthylases de l'ADN et des histones. L'induction de la répression transcriptionnelle s'opère par la diminution de l'accès des éléments régulateurs situés sur la chromatine aux facteurs de transcription.

Le complexe CoREST dont le nom a comme origine le facteur REST (RE1 silencing transcription) qui recrute les différents partenaires pour une fixation sur l'ADN au niveau d'un motif RE1, est situé sur de nombreux gènes encodant les caractéristiques neuronales. LSD1 au sein de ce complexe catalyse la déméthylation de l'histone H3 (cf II.D.2) pour contribuer à la facilitation de la répression.

Les composants du complexe NuRD semblent être plus variables. Ce complexe rassemble des protéines capables de lier l'ADN méthylé comme les protéines MBD (Methyl-binding protein), les protéines MTA (metastasis-associated protein) ainsi que des protéines comme Mi2 impliquées dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendante.

Les HDACs elles-mêmes peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. Cette dernière a pour conséquence d'augmenter leur activité enzymatique mais aussi de favoriser les interactions avec les autres partenaires protéiques (Sengupta and Seto, 2004).

2 – La méthylation

La méthylation qui se produit sur les résidus des queues des histones H3 et H4 est catalysée par les histones méthyltransférases (HMT). Un résidu peut être mono-, di- ou triméthylé. Ces enzymes sont classées en deux groupes distincts :

- les histones méthyltransférases (HKMTs) catalysent la méthylation sur les résidus lysines (K) ;
- les protéines méthyltransférases (PRMTs) catalysant la méthylation sur les résidus arginines.

Il existe cinq lysines qui peuvent être méthylées sur l'histone H3 (K4, K9, K27, K36 et K79) et une sur l'histone H4 (K20) (Figure 8). La méthylation sur les lysines H3K9, H3K27 et H4K20 a été proposée comme répresseur de la transcription. Plus particulièrement, les méthylations de H3K9 et H3K27 ont été reliées à l'inactivation du chromosome X (Mermoud *et al.*, 2002) et un fort enrichissement de H3K9 méthylée a été mis en évidence dans les régions centromériques hautement condensées correspondant à l'hétérochromatine. La méthylation de H4K20 a, quant à elle, été reliée à la chromatine silencieuse, transcriptionnellement inactive, ainsi qu'à la prévention de l'acétylation de H4K16, marque de chromatine active (Nishioka *et al.*, 2002). A l'inverse, la méthylation sur les lysines K4, K36 et K79 de l'histone H3 est liée à l'euchromatine et donc à une transcription active. Parmi ces méthylations, celle de H3K4 est la plus étudiée et semble jouer un rôle central dans la permissivité de la transcription en association avec H3K79 et H3K36. H3K79 et H3K4 méthylées ont été identifiées pour intervenir dans le blocage du déploiement de l'hétérochromatine et donc de la répression de la transcription (Nishioka *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2003a). La méthylation de H3K4 prévient la fixation du complexe de répression NuRD (cf II – D – 1) (Zegerman *et al.*, 2002) et les différents niveaux de méthylation semblent avoir un rôle sensiblement différent. En effet, la diméthylation sur H3K4 est reliée à l'euchromatine

mais ne l'est pas à des régions actives en transcription, tandis que la triméthylation est corrélée à des régions où les gènes sont transcrits et semble intervenir dès le début de la transcription (Ng *et al.*, 2003a ; Santos-rosa *et al.*, 2002). Des études ont montré que des complexes protéiques contenant des HKMTs étaient associés aux mécanismes d'élongation par l'ARN polymérase II et que ces HKMTs étaient impliquées dans la méthylation de H3K36 et H3K4 (Ng *et al.*, 2003b ; Gerber and Shilatifard, 2003).

Longtemps considérée comme une marque épigénétique stable et irréversible à cause de la difficulté de mettre en évidence des enzymes capables de déméthylar, la méthylation est en réalité une modification dynamique comme l'est l'acétylation. La première histone déméthylase a été découverte en 2004 (Shi *et al.*, 2004). Les histones lysines déméthylases (KDM) sont listées dans le tableau 3.

Famille	Membres	Substrats
KDM1	LSD1, BHC110, AOF2, LSD2, AOF1	H3K4me2/1 H3K9me2/1
KDM2	JHDM1A, CXXC8, FBL7	H3K36me2/1 H3K4me3
KDM3	TSGA, JHDM2A, JMJD1A2, JHMD2A, JHDM2B, NET22	H3K9me2/1
KDM4	JHDM3A, JMJD2, JHDM3B, JMJD2B, GASC1, JHDM3C, JMJD2C	H3K9me3/2 H3K36me3/2
KDM5	JARID1A, RBBP2, JARID1B, RBBP2H1A, PLU1, CT31, JARID1C, SMCX, XE169	H3K4me3/2
KDM6	UTX, JMJD3	H3K27me3/2
KDM7	JHDM1D	H3K9me2/1 H3K27me2/1
PHF8	JHDM1F, ZNF422	H4K20me1

Tableau 3. Les histones lysines déméthylases et les substrats associés. me, méthyle (Adapté de Crea *et al.*, 2012 ; Rotili and Mai, 2011 ; Liu *et al.*, 2010).

La méthylation des résidus arginine est moins étudiée que celle des lysines. Néanmoins, la méthylation sur le résidu arginine 3 de l'histone H4 a été décrite comme facilitant l'acétylation de H4 subséquente (Wang *et al.*, 2001) et ainsi permettre l'activation

de la transcription. Concernant la méthylation de H3R2, il a été démontré que la diméthylation de ce résidu pouvait être soit répresseur soit facilitateur de la méthylation de H3K4 et inversement, la triméthylation de H3K4 facilite la diméthylation de H3R2 (Binda, 2013). D'autre part, les méthylations sur les résidus arginines 8 et 26 de l'histone H3 sont répressives de la méthylation sur les résidus lysines 9 et 27 de l'histone H3. Ces données suggèrent qu'en plus du niveau de régulation par les HMTs, la méthylation sur des résidus spécifiques prévient ou facilite la méthylation sur d'autres résidus, et que cette régulation est probablement due à des changements conformationnels de la queue de l'histone (Binda, 2013).

La déméthylation des résidus arginines est moins connue et moins étudiée. Cependant, il a été mis en évidence que H3R2 et H4R3 étaient déméthylées par une déméthylase commune, JMJD6 (Chang *et al.*, 2007). Une autre enzyme, PAD4 semble également intervenir dans la déméthylation des arginines de H3 et H4 (Wang *et al.*, 2004).

3 – Autres modifications post-traductionnelles des histones

Parmi les autres modifications post-traductionnelles des histones figurent la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination. La phosphorylation est possible sur les résidus sérine et thréonine et les plus étudiées sont celles se trouvant sur l'histone H3. La phosphorylation sur l'histone H4 est également possible sur la sérine 1 et jouerait un rôle pendant la réparation de l'ADN (Cheung *et al.*, 2005). Concernant l'histone H3, la phosphorylation la mieux connue est celle de la sérine 10 (H3S10ph) qui est effectuée par l'enzyme Aurora B. Cette modification a été fortement liée à la mitose puisqu'on la retrouve en grande quantité lors du passage de la phase G2 à la prophase, sous-tendant un rôle dans la condensation des chromosomes (Van Hooser *et al.*, 1998), bien que d'autres données concluent à un rôle non essentiel dans cette condensation (de la Barre *et al.*, 2001). D'autres

phosphorylations comme H3S28 et H3T3 sont aussi retrouvées durant la mitose (Goto *et al.*, 2002 ; Dai *et al.*, 2005).

La phosphorylation sur l'histone H3 n'est pas seulement impliquée dans les événements mitotiques. En effet, elle est également importante dans la régulation de la transcription génique et plus particulièrement des gènes de réponse immédiate. *In vitro*, lorsqu'un stimulus est appliqué sur des cellules, celui-ci conduit à une activation des MAP kinases, notamment ERK, qui à leur tour induisent une activation des enzymes phosphorylant H3. Le blocage de la phosphorylation de H3 dans de tels protocoles semble inhiber l'expression des gènes de réponse immédiate confortant l'hypothèse que H3 intervient bien dans les mécanismes de la transcription (Clayton *et al.*, 2003).

Les histones peuvent être également modifiées par ubiquitination. Cette modification consiste en l'ajout sur des résidus lysines d'un groupement ubiquitine. Contrairement à la poly-ubiquitination des protéines qui conduit à la dégradation de celles-ci par le protéasome, l'ubiquitination des histones, et plus particulièrement celle des histones H2A, H2B, régule la transcription positivement ou négativement (Kouzarides, 2007).

La SUMOylation, qui consiste en l'ajout d'un groupement SUMO (small ubiquitin-related modifier) sur une lysine de H4, H2A ou H2B antagonise l'effet de l'acétylation et de l'ubiquitination qui ont lieu sur les mêmes résidus lysines ce qui induit la répression de la transcription génique (Nathan *et al.*, 2006).

D'autres modifications post-traductionnelles peuvent être effectuées sur la queue des histones, il s'agit de l'ADP ribolysation, la déimination et l'isomérisation des prolines. Ces différentes modifications semblent également jouer un rôle dans la régulation de la transcription (Kouzarides, 2007).

4 – Récapitulatif des modifications post-traductionnelles

L'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones que nous avons exposées précédemment sont rassemblées dans le tableau 4 afin de donner une vision globale du rôle de ces modifications biochimiques dans la transcription génique.

Histones	Résidus	Numéros	Modifications	Effet sur la transcription
H3	K	9, 14, 18, 23	Ac	Activateur
	K	4, 36, 79	me	Activateur
	K	9, 27	me	Répresseur
	R	2, 8, 26	me	Activateur / Répresseur
	S	10, 28	Ph	Activateur / Mitose
	T	3	Ph	Activateur / Mitose
H4	K	5, 8, 12, 16	Ac	Activateur
	K	20	me	Répresseur
	K		Sumo	Répresseur
	R	3	me	Activateur via H4Ac
	S	1	Ph	Réparation de l'ADN
H2A	K		Ub	Activateur / Répresseur
	K		Sumo	Répresseur
H2B	K		Ub	Activateur / Répresseur
	K		Sumo	Répresseur

Tableau 4. Récapitulatif des différentes modifications post-traductionnelles ayant lieu sur les différents résidus des queues d'histones et l'effet sur la transcription associé. H3 : histone H3 ; H4 : histone H4 ; H2A : histone H2 variant A ; H2B : histone H2 variant B ; K : lysine ; R : arginine ; S : serine ; T : thréonine ; Ac : acétylation ; me : méthylation ; Sumo : SUMOylation ; Ph: phosphorylation.

5 – Le « code » des histones

Nous venons de voir de façon plus ou moins détaillée les différentes modifications post-traductionnelles des histones qui régissent le fonctionnement de la chromatine, aussi bien lors des événements mitotiques, que lors de la régulation de la transcription génique. En 2000, le concept de « code histone » a émergé et provient du fait qu'une même modification peut être impliquée dans deux fonctions différentes. Celle, intrinsèque à la modification,

permettant de réguler positivement ou négativement la transcription et celle permettant l'accrochage de protéines régulatrices.

Il a été clairement établi que les différentes modifications post-traductionnelles des histones possèdent un genre de « communication ». Comme présenté dans la figure 10, certaines de ces modifications vont pouvoir provoquer l'établissement ou la suppression d'autres modifications. Ceci est permis par l'accrochage, sur les résidus modifiés post-traductionnellement, de protéines qui ensuite vont supprimer ou ajouter des groupements sur d'autres résidus. Par exemple, la lecture des groupements acétyles est effectuée par les lecteurs des acétyl-lysines à bromodomaine (BRD). La fixation entre les BRDs et les histones crée un échafaudage pour l'assemblage d'un complexe protéique qui modifie ensuite l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription conduisant finalement à la régulation de la transcription et au remodelage de la chromatine elle-même.

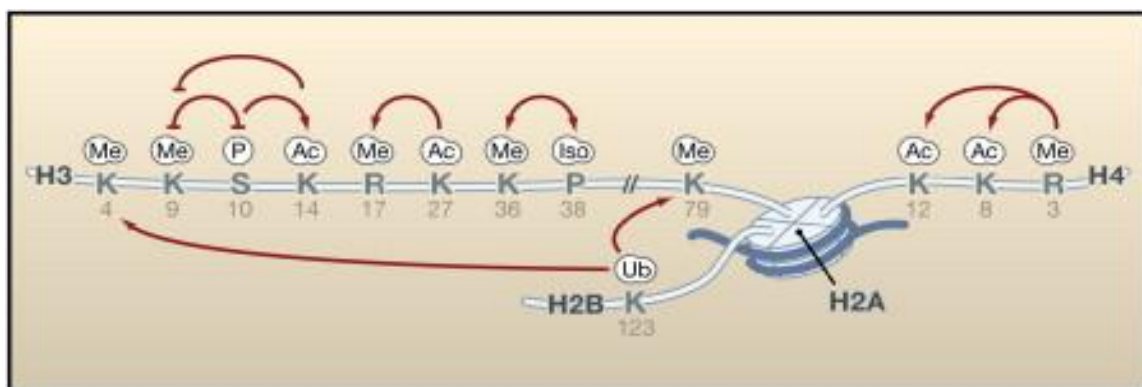


Figure 10. Interactions entre les différentes modifications des histones influençant positivement ou négativement d'autres modifications post-traductionnelles (Kouzarides, 2007).

E – La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un autre niveau de régulation épigénétique décrite pour être essentiellement associée à la répression transcriptionnelle. Cette marque épigénétique correspond à l'ajout sur les résidus cytosines en position 5 d'un groupement méthyle donnant ainsi une 5-méthylcytosine (5mC). Cette méthylation a lieu uniquement dans le contexte d'un

enchaînement d'une cytosine (C) et d'une guanine (G) relié par un pont phosphodiester (p) formant ainsi le dinucléotide CpG. Cette modification est une marque héritable et a très bien été caractérisée dans les processus d'inactivation du chromosome X. Il est estimé que 80 % des sites CpG dans le génome sont méthylés (Rothbart and Strahl, 2014). La méthylation de l'ADN a été classiquement montrée pour intervenir dans l'extinction transcriptionnelle au travers d'un blocage de l'interaction avec les facteurs de transcription mais également pour servir de support aux protéines ayant un domaine de fixation pour les groupements méthyles, les *methyl-binding protein* (MBD) qui vont être associées dans un complexe répresseur.

Théoriquement, la fréquence du nucléotide CpG devrait être largement supérieure à ce qui est observé dans la réalité. Cette sous représentation provient du fait que les cytosines méthylées dans le contexte CpG sont très sensibles à la mutation et se transforment en thymine par désamination (Issa, 1999). Cependant, certaines régions du génome présentent une fréquence de CpG élevée qui parfois devient supérieure à ce qui est attendu théoriquement. Ces régions riches en CpG sont appelées des îlots CpG. Pour être considéré comme tel, un îlot doit rassembler plusieurs paramètres :

- avoir une taille comprise entre 0,3 et 3 000 bp ;
- avoir un pourcentage de C et G supérieur à 50 % ;
- avoir un ratio de CpG observé / attendu supérieur à 0,6.

1 – Contrôle de la méthylation

Ces îlots sont majoritairement retrouvés au niveau des promoteurs des gènes et sont généralement non méthylés (Suzuki and Bird, 2008 ; Prioleau, 2009). Les enzymes qui contrôlent la méthylation sont les ADN méthyltransférases (DNMTs) qui utilisent un cofacteur, la S-adenosyl-méthionine comme donneur de groupement méthyle (Goll and Bestor, 2005). Il existe différentes DNMTs et les principales sont : DNMT1, DNMT3A et

DNMT3B. La DNMT1 est impliquée dans le maintien de la méthylation tandis que les DNMT3A et 3B sont responsables de la méthylation *de novo* (Figure 11).

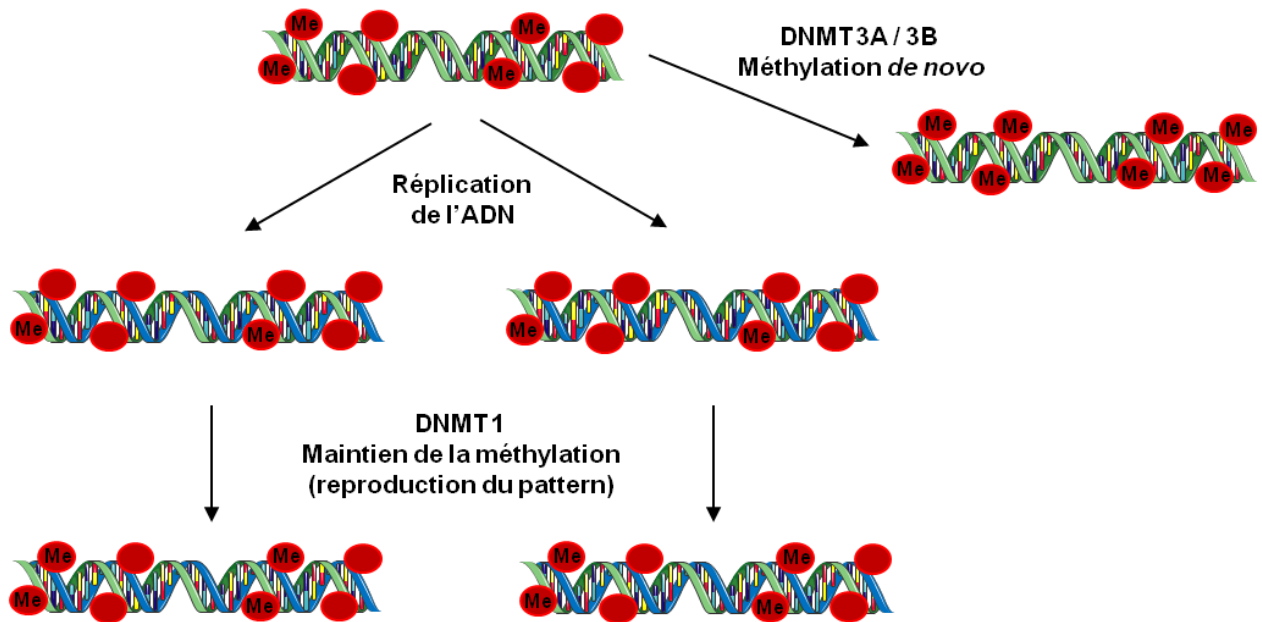


Figure 11. Méthylation de l'ADN catalysée par les enzymes DNMT1, 3A et 3B. Lors de la réplication de l'ADN, la DNMT1 permet de reproduire le pattern de méthylation à partir du brin matrice. Les DNMT3A et 3B sont impliquées dans la méthylation *de novo* donc dans la régulation de la transcription en changeant le profil de méthylation. Me, cytosine méthylée.

La DNMT1 contrôle le maintien de la méthylation dans les cellules en prolifération en copiant le patron de méthylation du brin d'ADN matrice sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé en suivant la fourche de réplication (Bostick *et al.*, 2007 ; Sharif *et al.*, 2007).

La méthylation *de novo* établi par les enzymes DNMT3A et 3B joue un rôle prépondérant pendant l'embryogenèse mais également dans le développement en établissant les profils de méthylation (Kaneda, 2004).

2 – Contrôle de la transcription génique

La méthylation de l'ADN permet de recruter des protéines de liaison à l'ADN méthylé, les *Methyl-CpG-Binding Proteins* (MBPs) (Joulie *et al.*, 2010). Les MBPs sont au nombre de 10 réparties en 3 familles :

- la famille des protéines MBD (Methyl-CpG-Binding-Domain) composée de MeCP2, MBD1, MBD2 et MBD4 ;
- la famille des protéines à domaine SRA (Set and Ring finger-Associated) comprenant UHRF1 et UHRF2 ;
- la famille des protéines à doigts de zinc composée de ZFP57, ZBTB4, Kaiso et ZBTB38.

Toutes ces protéines vont se lier à l'ADN méthylé en reconnaissant les groupements méthyles par leur domaine respectif (MBD, SRA ou doigts de zinc). Elles sont considérées comme les effectrices de la méthylation de l'ADN. En se liant à l'ADN méthylé, elles créent un signal de répression transcriptionnelle en recrutant des histones désacétylases par exemple, ainsi que d'autres co-répresseurs pour créer une chromatine silencieuse.

3 – Déméthylation de l'ADN

La déméthylation de l'ADN peut se produire soit passivement soit activement. La déméthylation passive s'opère par blocage du maintien du profil de méthylation dans les cellules en prolifération. En revanche, la déméthylation active fait intervenir un complexe enzymatique sur la base à déméthyliser. La première étape de cette déméthylation est la déamination ou l'oxydation de la base à déméthyliser. La déamination de la 5mC est opérée par le complexe enzymatique AID/APOBEC1 (Activation-Induced Deaminase)/(APOlipoprotein B mRNA-Editing enzyme Complex-1), tandis que l'oxydation est catalysée par les dioxygénases de la famille Tet (Ten-eleven translocation) et transforme la 5mC en 5-

hydroxymethylcytosine. Ensuite, la suppression de la base est effectuée par un mécanisme d'excision faisant intervenir deux glycosylases de l'ADN, TDG (Thymine DNA Glycosylase) et MBD4 ainsi que les facteurs de la famille GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage inducible protein 45) (Figure 12).

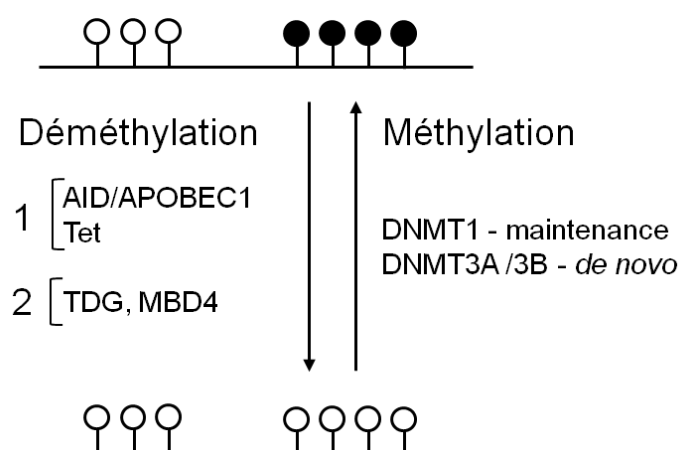


Figure 12. Méthylation et déméthylation de l'ADN dans le contexte CpG. Les cytosines méthylées (cercle plein) peuvent être déméthylées par l'action de AID/APOBEC1 ou Tet et ensuite par les enzymes TDG et MBD4. La méthylation des cytosines non méthylées (cercle vide) sera effectuée par l'action des DNMTs (Adaptée de Kasprzyk *et al.*, 2013).

F – Ethanol et épigénétique : de la prise aiguë à l'addiction

1 – Effet d'une prise aiguë

La prise aiguë d'éthanol est caractérisée au niveau comportemental, à la fois chez l'humain et chez le rongeur, par une réduction du niveau d'anxiété (Moonat *et al.*, 2010 ; Pandey *et al.*, 2008 ; Sakharkar *et al.*, 2012 ; Wilson, 1988). Cet effet anxiolytique a été corrélé chez des rats préférant pour l'éthanol à une diminution de l'activité des HDACs et une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'amygdale, région du système limbique impliquée dans le contrôle émotionnel (Pandey *et al.*, 2008). De plus, une augmentation d'activité de la protéine CREB liant la protéine CBP (CREB-binding protein, ayant une activité histone acétyltransférase) est observée dans les régions amygdaloïdes de

rats préférant pour l'alcool après une exposition aiguë à l'éthanol (Pandey *et al.*, 2005). Ces modifications épigénétiques entraînent une relaxation de la chromatine, conduisant à une augmentation de l'expression du neuropeptide Y (NPY) désignée comme responsable de l'effet anxiolytique de l'éthanol et le contrôle de la prise d'alcool (Zhang *et al.*, 2010), comme nous l'avons déjà mentionné plus haut.

Des études s'intéressant aux conséquences d'une sensibilisation à l'éthanol dans le striatum des souris DBA/2J ont montré que l'activité des enzymes DNMTs et HATs n'était pas modifiée par l'éthanol tandis que celle des HDACs l'était, associée à une augmentation de l'acétylation de H4 (Botia *et al.*, 2012).

L'étude de Sakharkar et ses collaborateurs (2012) propose le modèle suivant pour expliquer le basculement d'une prise aiguë à une consommation chronique. Lorsque des animaux sont exposés une première fois à l'éthanol, celui ci induit des modifications dans l'activité des HDACs ainsi que des modifications d'acétylation provoquant une relaxation de la chromatine et un effet anxiolytique associé, au moins en partie, à une augmentation de l'expression de NPY. Lors de la seconde exposition, ces effets observés ne sont plus retrouvés et la chromatine reste dans un état que l'on pourrait qualifier de « normal » avec un niveau d'anxiété plus élevé que lors de la première exposition, incitant alors une consommation plus importante afin de retrouver les effets comportementaux initiaux, créant ainsi le phénomène de renforcement et conduisant à une consommation chronique.

2 – Effet d'une prise chronique

a – La méthylation de l'ADN

La mise en évidence du rôle de la méthylation de l'ADN dans la consommation d'éthanol a été effectuée par Williams RJ (1949). Il a démontré qu'un régime alimentaire carencé en vitamine B chez les rats induisait une augmentation de la consommation d'éthanol

tandis qu'un régime riche en vitamine B la diminuait. Ces effets peuvent s'expliquer par le rôle critique de la vitamine B dans la synthèse de la S-adenosyl-méthionine (SAM), donneur de groupement méthyle pour la méthylation des cytosines de l'ADN. Il était alors probable qu'une carence en donneur de méthyle soit responsable de l'augmentation de la consommation d'éthanol chez ces rats, à cause de la perturbation de la régulation de l'expression de certains gènes.

Hormis l'effet de l'éthanol sur la synthèse de la SAM, la consommation chronique d'éthanol peut affecter d'autres mécanismes impliqués dans la méthylation de l'ADN. Un métabolite de l'éthanol a été décrit comme altérant l'activité de la DNMT1 (Garro *et al.*, 1991) et, par ailleurs, il a été montré que les dommages créés par l'alcool résultaient de l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, conduisant à une déméthylation des cytosines (Kruman *et al.*, 2012 ; Fowler *et al.*, 2012). Ces deux mécanismes conduiraient ainsi à une réduction du niveau de méthylation de l'ADN, donc à une hypométhylation globale.

Des études réalisées chez l'homme montrent cependant que l'hypométhylation de l'ADN n'est pas homogène et que seulement certaines régions de l'ADN sont soumises à une déméthylation, comme les gènes riches en dinucléotides GC et les rétrovirus endogènes (Antony *et al.*, 2004, Pnomoarev *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'analyse de 180 000 gènes chez des personnes saines et des alcooliques, montre que des groupes de gènes subissent une déméthylation et d'autres une méthylation mettant ainsi évidence des mécanismes épigénétiques globaux et complexes induits par l'alcool (Manzardo *et al.*, 2012).

Une autre série d'étude s'est intéressée à la méthylation de la protéine α -synucléine dont le rôle dans la consommation d'alcool a été bien décrit : cette protéine est surexprimée, notamment dans l'hippocampe, chez des rats consanguins éthanol-préférant (Liang *et al.*, 2003). L'expression de cette protéine, reliée au « craving » est également augmentée de façon significative chez les alcoolos-dépendant (Bönsch *et al.*, 2004). Le profil de méthylation du

promoteur de l' α -synucléine est augmenté chez les patients alcooliques (Bönsch *et al.*, 2005) suggérant que la consommation d'alcool peut induire de manière gène-spécifique un changement dans le profil de méthylation.

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* appuient l'hypothèse gène-spécifique de l'altération de la méthylation. Dans des cultures de cellules neuronales, il a été montré que l'exposition à l'éthanol induisait une réduction de l'expression des gènes du cycle cellulaire associée à leur hyperméthylation et une augmentation de l'activité des DNMTs (Hicks *et al.*, 2010). Inversement, une augmentation des transcrits de la sous-unité GluN2B du récepteur glutamatergique NMDA est associée à une déméthylation de son promoteur après un traitement chronique à l'éthanol chez la souris (Marutha Ravindran and Ticku, 2004).

b – Les modifications des histones

Les études menées chez l'homme ont montré que la consommation chronique d'alcool était responsable de modifications épigénétiques majeures au niveau du SNC. L'abus chronique d'alcool induit une augmentation globale et gène-spécifique de la triméthylation de H3K4 dans le cortex (Ponomarev *et al.*, 2012). Néanmoins il est possible de trouver soit une augmentation soit une diminution de cette marque épigénétique au niveau des promoteurs de certains gènes, non corrélées avec la transcription génique. Ces données suggèrent que H3K4me3, en tant que marque d'une chromatine accessible, ne serait pas suffisant pour permettre la modification d'expression des gènes (Zhou *et al.*, 2011 ; Bernstein *et al.*, 2007) mais que cet état de transcription permissive entraînerait une réactivation ultérieure de la transcription génique (Taqi *et al.*, 2011).

La mise en évidence de l'implication des modifications épigénétiques dans les effets induits par la prise d'éthanol chronique a été autorisée, en partie, par l'utilisation des inhibiteurs d'HDACs dans les modèles animaux. Lors du sevrage de la consommation

chronique d'éthanol, une augmentation significative des comportements de type anxieux a été observée chez des animaux éthanol-préférant, associée à l'augmentation de l'activité des HDACs et la diminution de l'acétylation des histones H3K9 et H4K8 dans l'amygdale (Pandey *et al.*, 2008). Le traitement de ces animaux par des inhibiteurs d'HDACs comme la trichostatine A (TSA) inverse les effets induits par l'arrêt de la consommation d'éthanol. Le sodium butyrate (NaB), un autre inhibiteur de HDACs altère les comportements liés à la consommation d'éthanol comme la sensibilisation locomotrice (Sanchis-Segura *et al.*, 2009 ; Legastelois *et al.*, 2013). De plus, chez des animaux éthanol-préférant ayant continuellement accès à l'alcool et à de l'eau, l'injection quotidienne de TSA augmente la consommation d'alcool en libre choix (Wolstenholme *et al.*, 2011). Ces données soulignent que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle prépondérant à la fois dans la régulation de la consommation d'alcool mais également dans les effets directs induits par l'éthanol.

Ces modifications de marques épigénétiques au niveau central ne sont pas homogènes. L'éthanol augmente l'acétylation dans certaines régions comme le cortex préfrontal et le noyau accumbens, mais la réduit dans d'autres comme le striatum (Pascual *et al.*, 2009). Il semble aussi que l'effet de l'éthanol ne soit pas le même dans le cerveau « adulte » et dans le cerveau « adolescent », ce dernier présentant généralement plus de modifications épigénétiques provoquant un remodelage de la chromatine et étant corrélées avec l'induction d'une préférence de place conditionnée à l'éthanol (Pascual *et al.*, 2009 ; Pascual *et al.*, 2012).

Les changements d'acétylation lors de la prise d'éthanol ne sont pas forcément reliés à une modification de l'expression génique et les mécanismes permettant de réguler l'expression de gènes spécifiques lors de la consommation d'alcool ne sont pas encore bien connus. Cependant, des études semblent clairement impliquer le facteur de transcription CREB dans les réponses à la prise d'éthanol. CREB se lie à CBP, protéine possédant une activité HAT intrinsèque, qui induit l'activation de la transcription génique après fixation sur

les éléments régulateurs situés sur l'ADN. Des études ont montré que dans l'amygdale de rats éthanol-préférant, l'expression de CREB et de sa forme activée (P-CREB) était diminuée, limitant ainsi sa fixation à l'ADN. Ces différences relevées chez les animaux préférant, *versus* des animaux non préférant, semblent être corrélées aux comportements de type anxieux et à une consommation d'éthanol plus importante (Pandey *et al.*, 1999 ; Pandey *et al.*, 2005). Ainsi, des niveaux bas de CREB, et donc de liaison à CBP, pourraient induire des diminutions d'acétylation des histones et permettre la répression de la transcription génique pendant la consommation chronique d'éthanol. Des données chez l'homme pourraient conforter cette hypothèse. Les niveaux d'expression de CREB et de CBP semblent être largement diminués chez les patients alcooliques et parallèlement, l'expression des transcrits encodant les différents partenaires protéiques des complexes répresseurs de transcription, notamment associées au HDAC, est augmentée (Ponomarev *et al.*, 2012 ; Zhou *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2006).

La consommation chronique d'éthanol induit chez l'humain une perte du volume des régions corticales et sous corticales, certainement responsable des déficits cognitifs observés (Crews and Nixon, 2009). Une des régions sensibles à la consommation d'éthanol est l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. Une consommation chronique d'éthanol, diminue l'activité de CREB et réduit la neurogenèse située dans la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (nous détaillerons plus loin). La diminution de l'expression de CREB, et donc du recrutement de CBP, provoque une altération de la transcription des gènes cibles de CREB et notamment ceux contrôlant la neurogenèse (Crews and Nixon, 2009). Les conséquences épigénétiques de la prise d'éthanol sur l'hippocampe à l'âge adulte sont encore mal connues et peu étudiées. Néanmoins, des études ont été menées dans d'autres structures cérébrales. Il a été montré que la prise chronique d'éthanol affectait l'expression du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor),

protéine régulant la neurogenèse de l'hippocampe, la plasticité synaptique mais également la consommation d'éthanol dans le striatum (Janak *et al.*, 2006 ; Jeanblanc *et al.*, 2013a,b ; Jeanblanc *et al.*, 2009). Des analyses menées dans l'amygdale de rat éthanol-préférant ont révélé que l'activité des HDACs nucléaires et notamment de la HDAC2 était largement supérieure à des rats non éthanol-préférant. Ces modifications sont corrélées avec une faible acétylation de H3K9 et H3K14. Lors d'une exposition à l'éthanol, les rats éthanol-préférant présentent une diminution de l'activité de HDAC2 associée à une augmentation de l'acétylation du gène du BDNF et une atténuation des comportements de types anxieux. La suppression de l'expression de HDAC2 induit une baisse des comportements de types anxieux et une augmentation de l'acétylation sur le gène du BDNF ainsi qu'une atténuation de la prise volontaire d'éthanol (Moonat *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces données, associées avec celles exposées dans la partie sur la neurobiologie de l'alcoolodépendance, font état de mécanismes neuro-adaptatifs complexes, induits par la prise chronique d'éthanol et responsables du maintien de cette consommation. Le BDNF, dont nous venons de parler, exerce un rôle majeur dans les phénomènes de plasticité cérébrale dans les maladies psychiatriques (Boulle *et al.*, 2012) et les addictions notamment à l'alcool (Davis, 2008). Par ailleurs, son rôle est clairement démontré dans le processus neurogénique de l'hippocampe chez l'adulte, une forme de plasticité cérébrale indispensable au maintien des performances cognitives tout au long de la vie d'un individu. Nous nous attacherons dans la partie suivante à apporter les éléments nécessaires à la compréhension de la régulation de la neurogenèse hippocampique adulte et terminerons par les effets de l'alcool sur cette forme de plasticité.

III – NEUROGENESE ADULTE ET PLASTICITE

La neurogenèse est définie comme une production de neurones à partir de cellules souches multipotentes. Nous pouvons distinguer deux types de neurogenèse :

- embryonnaire, qui débute *in utero* et se poursuit durant le développement ;
- adulte, qui se poursuit tout au long de la vie d'un individu.

La neurogenèse est un processus séquentiel qui commence par la prolifération des cellules souches, ou précurseurs neuronaux, afin de donner naissance à une cellule fille qui va ensuite se différencier pour acquérir les caractéristiques requises pour son intégration ultérieure au réseau neuronal préexistant. La dernière étape, qui n'est pas la moins importante, est la survie de ces cellules nouvellement formées pour pouvoir établir des connexions stables et fonctionnelles avec les autres cellules.

Chez les rongeurs, deux zones sont soumises à une neurogenèse à l'âge adulte. La première concerne la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux. Les neurones qui y sont produits vont ensuite cheminer le long d'une voie de migration rostrale (Rostral Migratory Stream : RMS) pour intégrer le bulbe olfactif (Figure 13). La seconde zone se trouve au niveau de l'hippocampe et plus particulièrement au niveau de la zone sous granulaire qui borde le gyrus denté. Les neurones produits dans cette zone migreront dans la couche granulaire afin d'être intégrés au réseau neuronal hippocampique (Figure 13).

Chez l'homme, on a longtemps pensé que la neurogenèse adulte produisait très peu de neurones. Très récemment, ce dogme a été bousculé par une équipe du *Karolinska Institute* en Suède (Spalding *et al.*, 2013). La stratégie originale adoptée par cette équipe est née des essais nucléaires réalisés pendant la guerre froide. Lors de ces essais, le niveau atmosphérique de carbone 14 (^{14}C) était très élevé et a commencé à décroître après la signature du traité d'interdiction partielle des essais nucléaires en 1963 concernant les essais réalisés dans l'atmosphère et sous l'eau. Cette décroissance était due à l'absorption du ^{14}C par le biotope

pour la constitution des biomolécules, notamment lors de photosynthèse. L'homme en consommant ces plantes ou les animaux qui les avaient consommées, a absorbé à son tour le ^{14}C . Ce carbone a été ensuite incorporé à son ADN lors des événements de mitose pour la duplication des chromosomes. L'intégration du ^{14}C dans l'ADN nouvellement synthétisé a été effectuée suivant la concentration atmosphérique présente à l'époque. Cette équipe a utilisé une méthode de datation fine au ^{14}C afin de définir la date exacte de naissance des cellules néoformées de façon rétrospective. Ils ont ainsi pu démontrer que, dans le cerveau humain adulte, la neurogenèse adulte était aussi importante que chez le rongeur, supportant ainsi l'hypothèse selon laquelle la neurogenèse adulte contribue à la fonction du cerveau chez le mammifère.

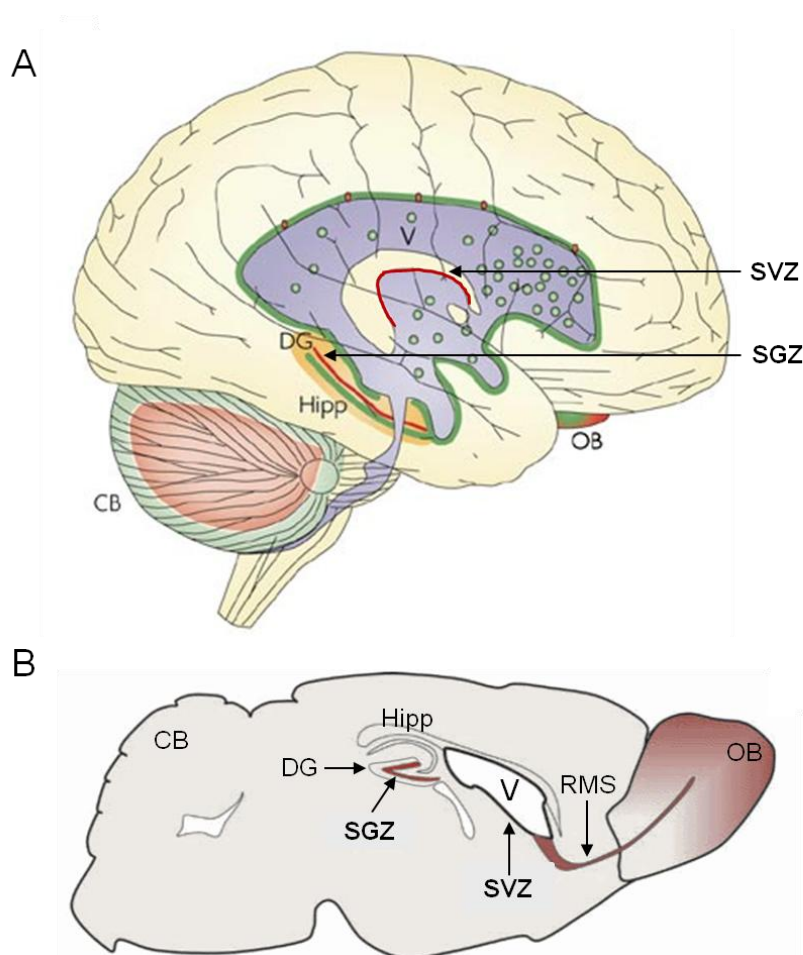


Figure 13. Représentation schématique des zones soumises à une neurogenèse adulte chez l'humain (A) et chez le rongeur (B). SVZ, zone sous-ventriculaire ; SGZ, zone sous-granulaire ; Hipp, hippocampe ; DG, gyrus denté ; V, ventricule latéral ; RMS, voie de migration rostrale ; OB, bulbe olfactif ; CB, cervelet (Adaptée de Ghashghaei *et al.*, 2007).

L'homme apparait comme étant le seul mammifère chez qui la neurogenèse du bulbe olfactif n'est pas détectable (Bergmann et al., 2012 ; Sanai et al., 2011). Cependant, les cellules souches de la zone sous-ventriculaire responsables de la neurogenèse du bulbe olfactif sont également présentes chez l'homme mais ne migrent quasiment pas au niveau du bulbe. L'équipe suédoise mentionnée précédemment a démontrée, avec la même technique de datation, que ces cellules souches humaine migraient vers le striatum pour former des interneurons tout au long de la vie de l'individu (Ernst *et al.*, 2014). Ces données inattendues posent maintenant de nouvelles questions : pourquoi existe-t-il une neurogenèse striatale chez l'humain et pas chez les autres espèces ? Quelle est la fonction de ces nouvelles cellules ?

Nous détaillerons ici uniquement la neurogenèse hippocampique adulte qui a fait l'objet des études exposées dans la suite du manuscrit. Nous parlerons de la régulation et l'implication dans la fonction du cerveau adulte du maintien de la production de nouvelles cellules ainsi que les conséquences d'une exposition à l'éthanol sur la neurogenèse.

A – L'hippocampe

1 – Les connectivités

L'hippocampe est une structure bilatérale et symétrique appartenant au système limbique. Il est situé au sein des lobes temporaux des hémisphères cérébraux et se compose (Figure 14):

- de quatre aires contiguës formant la Corne d'Ammon (CA), CA1, CA2, CA3 et CA4)
- du subiculum
- du gyrus denté (DG)
- de l'hilus du DG

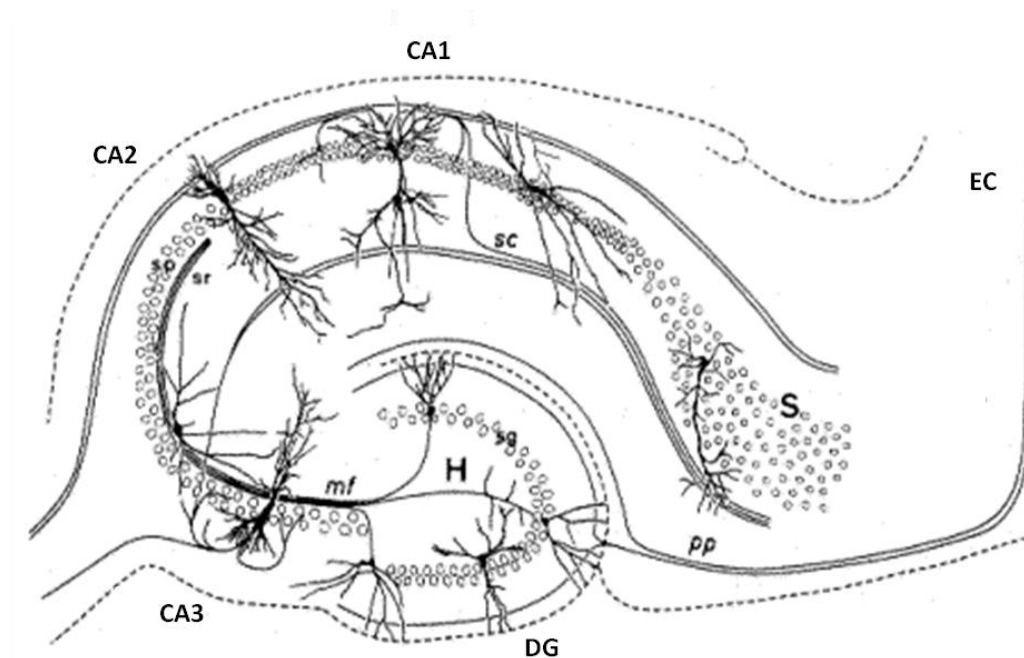


Figure 14. Schéma structural de la formation hippocampique chez le rongeur. CA1, CA2 et CA3, corne d'Ammon ; DG, gyrus denté ; H, hilus ; sg, *stratum granulosum* ; mf, fibres moussues ; sr, *stratum radiatum* ; sp, *stratum pyramidale* ; sc, collatérales de Schaffer ; S, subiculum ; EC, cortex entorhinal ; pp, voie perforante.

L'hippocampe possède deux types majoritaires de cellules nerveuses : les cellules pyramidales qui composent le *stratum pyramidale* de la corne d'Ammon et les cellules granulaires formant le *stratum granulosum* dans le DG (Figure 14). Le circuit hippocampique le plus simple est un circuit trisynaptique et unidirectionnel. Illustrées sur la figure 14, les cellules du cortex entorhinal (EC) envoient leurs axones vers les cellules granulaires du DG formant ainsi la voie perforante (pp). Les axones des cellules granulaires du DG appelés fibres moussues (mf) projettent vers CA3 qui à leur tour contactent CA1 par leurs axones appelés collatérales de Schaffer (sc). Enfin, les neurones de CA1 envoient leur projection en dehors de l'hippocampe par le subiculum qui projette ensuite vers le cortex entorhinal formant ainsi une boucle. D'autres sous-régions de l'hippocampe telles que CA1, CA3 et le subiculum sont directement contactées par le cortex entorhinal.

L'hippocampe droit et gauche communique par le biais des afférences commissurales passant par la fimbria. Les différentes sous-régions de l'hippocampe communiquent entre

elles par des connexions dites homotopiques. Ainsi, CA3 projette vers CA3 et CA1 vers CA1. En revanche, le CA1 et le DG reçoivent des afférences de CA3.

En plus des afférences reçues de l'hippocampe controlatéral et du cortex enthorinal, l'hippocampe reçoit des afférences de l'aire du septum médian qui se projettent sur les neurones pyramidaux et les interneurons de la corne d'Ammon et du DG. Des projections du tronc cérébral se projettent également sur les neurones pyramidaux de CA1, CA3 et sur le DG et exercent une action inhibitrice.

Les neurones pyramidaux concentrent leurs axones dans un faisceau appelé fornix qui longe l'hippocampe créant ainsi la principale voie efférente de l'hippocampe. Le fornix se projette vers le noyau accumbens, la formation réticulée ou encore le tronc cérébral.

2 - La zone sous-granulaire du gyrus denté et la neurogenèse

Comme évoqué précédemment, l'hippocampe est une région du cerveau adulte qui produit de nouvelles cellules tout au long de la vie d'un individu. Cette production se situe dans la SGZ, région à l'interface de l'hilus et de la couche des cellules granulaires (GCL) du DG (Figure 15). L'épaisseur de la SGZ est d'environ 50 μm et elle est composée de niches de cellules souches et de progéniteurs. Ces deux types de cellules possèdent des vitesses de division différentes. Les premières sont les cellules souches de type 1 (NSC type 1) qui sont soit quiescentes, soit à vitesse de division lente. Ces cellules expriment la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein) et la nestine, sont orientées radialement et s'étendent au travers de la couche granulaire (Kempermann *et al.*, 2004). Les autres cellules de type 1 ont une orientation horizontale et se divisent plus rapidement (Lugert *et al.*, 2010) (Figure 15). La neurogenèse débute par la division des cellules NSC de type 1 permettant ainsi de générer des progéniteurs à amplification transitoire (TAPs) qui ont la capacité de se différencier par la suite en neurones ou en astrocytes. Lors de la division cellulaire, ces cellules peuvent être

identifiées par la présence de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ou encore du Ki-67 (von Bohlen und Halbach, 2011). Les TAPs sont de petites cellules qui sont retrouvées en groupe au sein de la SGZ.

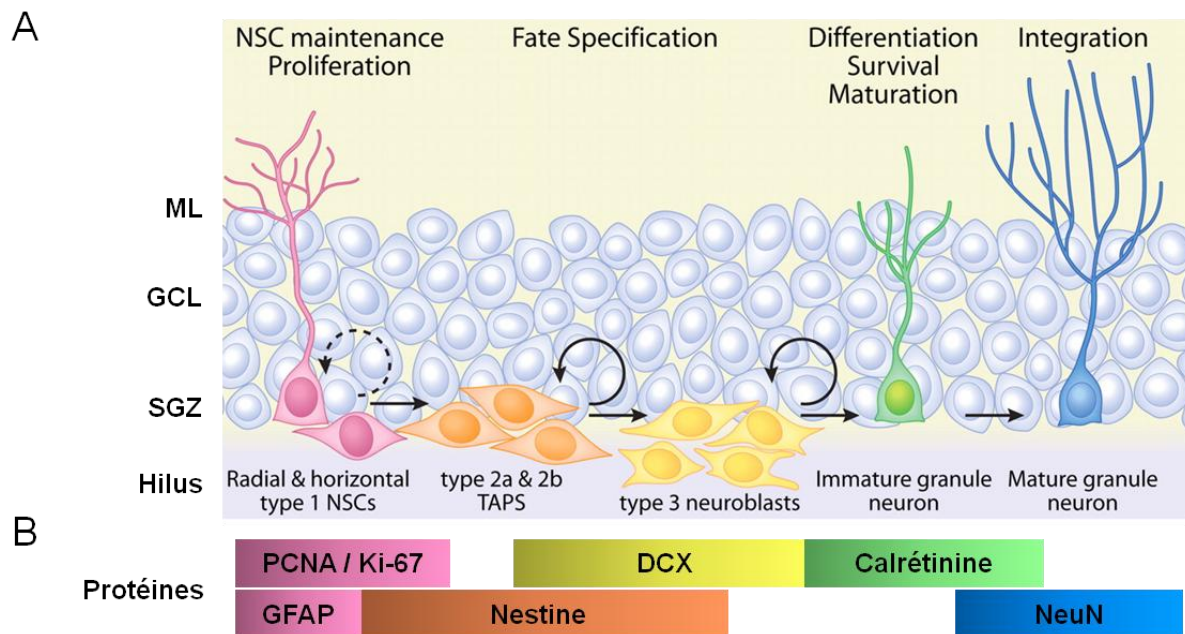


Figure 15. La neurogenèse adulte au niveau de la SGZ du gyrus denté de l'hippocampe : marqueurs protéiques. (A) La SGZ est composée de cellules souches neuronales radiales et horizontales (NSCs, rose) ; de progéniteurs à amplification transitoire (TAPs, orange) ; de neuroblastes (jaune) ; de neurones granulaires immatures (vert) ; de neurones granulaires matures (bleu). (B) La progression de la différenciation neuronale peut être suivie par l'enchaînement successif de marqueurs protéiques. ML, couche moléculaire ; GCL, couche de cellules granulaires ; SGZ, zone sous-granulaire (Adaptée de Hsieh J, 2012).

Différents types de TAPs sont à distinguer : les TAPs 2a, 2b et 3 (Kronenberg *et al.*, 2003). Ils peuvent être identifiés par des marqueurs cellulaires représentatifs du stade de différenciation des cellules. Les types 2a expriment la protéine nestine tout comme le type 2b. En plus de l'expression de la nestine, le type 2b exprime également la doublecortine (DCX). La progression vers le type 3 puis vers le développement d'un nouveau neurone s'accompagne de la suppression de l'expression de la nestine associée au maintien de l'expression de la DCX. Enfin, la baisse d'expression de la DCX puis l'augmentation de l'expression de la calrétinine et de la protéine NeuN marque la transition entre les neurones immatures et les neurones matures (Figure 15). Ces nouvelles cellules formées sont des

cellules granulaires glutamatergiques qui seront structurellement et fonctionnellement matures en 6 à 8 semaines (Van Praag *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2006).

3 – La régulation de la neurogenèse

a – La régulation par les facteurs de transcription

Les différentes étapes de la neurogenèse décrites précédemment sont contrôlées par un enchainement de facteurs de transcription à chaque stade de la prolifération et de la différenciation (Figure 16).

L'entrée en prolifération des NSCs de type 1 ou l'auto-renouvellement du stock de cellules souches semblent être contrôlés par des facteurs de transcription tels que Sox2 (SR-box transcription factor 2). En effet, les NSCs radiales et horizontales expriment largement Sox2 (Komitova and Eriksson, 2004 ; Lugert *et al.*, 2010) et l'expression de Sox2 coïncide avec l'expression de PCNA qui est un marqueur de prolifération des cellules de type 2a (Ferri *et al.*, 2004). Le rôle de Sox2 semble se situer d'avantage dans le maintien de la population de cellules souches neuronales et dans l'auto-renouvellement. En effet, différentes études ont montré que la baisse d'activité de la signalisation Notch, impliquée dans la différenciation et la communication cellulaire, est associée à la diminution d'expression de Sox2 conduisant à une déplétion des cellules de type 1 et une différenciation prématurée en neurones (Ehm *et al.*, 2010 ; Ables *et al.*, 2010). En plus de ce lien avec Sox2, la signalisation Notch semble cibler des facteurs de transcriptions appartenant à la famille bHLH (basic Helix-Loop-Helix) afin de maintenir le pool de NSCs. C'est le cas de Mash1 (ou Ascl1) dont l'expression est retrouvée dans les cellules de type 1 mais également de type 2 (Pleasure *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2007). Un autre facteur de transcription qui intervient dans la régulation de la quiescence des NSCs est REST (RE1 silencing transcription factor). Ce facteur est impliqué dans la répression de la différenciation neuronale lors du développement embryonnaire (Aoki *et al.*, 2012) et est

exprimé dans les cellules de type 1. Son expression est diminuée dans les cellules exprimant NeuroD1, un autre facteur de transcription appartenant à la famille bHLH marquant un stade plus avancé de la différenciation neuronale (Gao *et al.*, 2011). L'ensemble de ces facteurs intervient dans la régulation de l'auto-renouvellement du pool de cellules souches et permet ainsi de le maintenir en réprimant l'expression des gènes neuronaux.

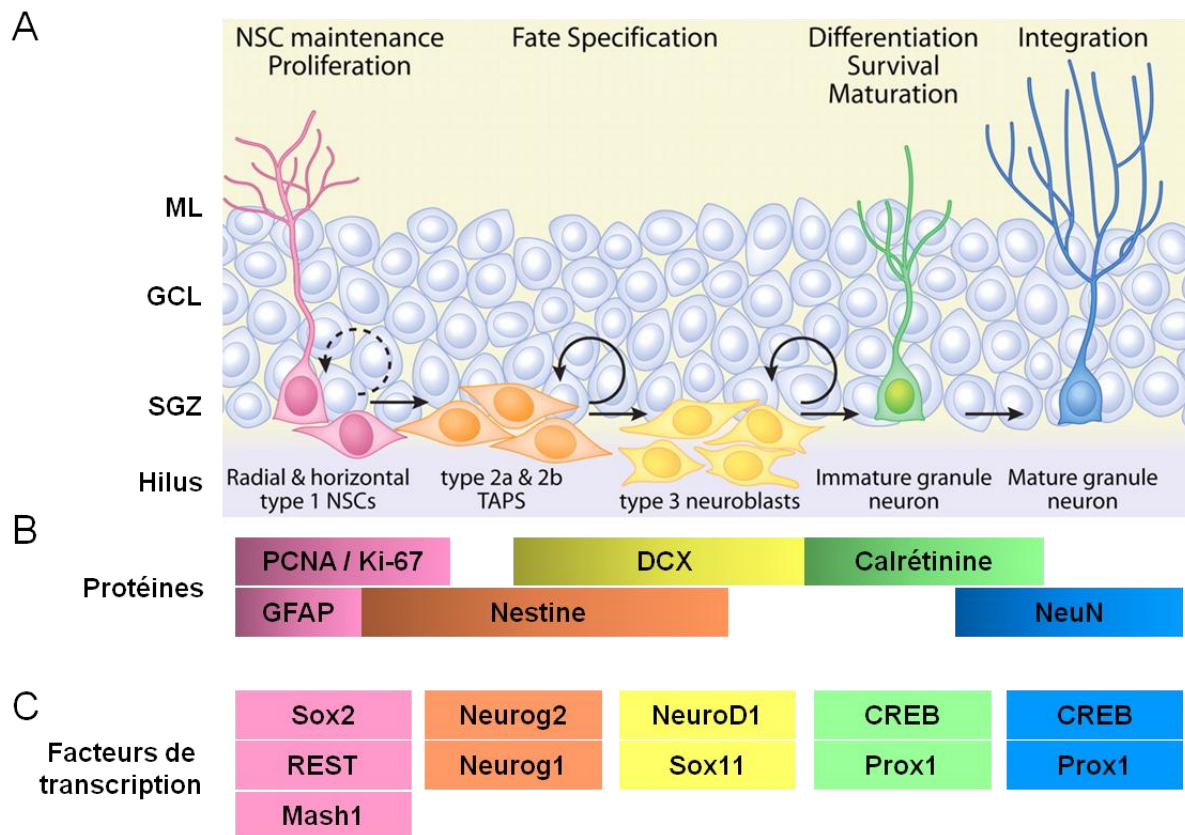


Figure 16. Neurogenèse adulte au niveau de la SGZ du gyrus denté de l'hippocampe : marqueurs transcriptionnels. (A) La SGZ est composée de cellules souches neuronales radiales et horizontales (NSCs, rose) ; de progéniteurs à amplification transitoire (TAPs, orange) ; de neuroblastes (jaune) ; de neurones granulaires immatures (vert) ; de neurones granulaires matures (bleu). (B) La progression de la différenciation neuronale peut être suivie par l'enchaînement successif de marqueurs protéiques. (C) Chaque étape de la neurogenèse est contrôlée par l'expression séquentielle de facteurs de transcription. ML, couche moléculaire ; GCL, couche de cellules granulaires ; SGZ, zone sous-granulaire (Adaptée de Hsieh J, 2012).

La transition des cellules de type 1 aux TAPs et neuroblastes (type 3) est marquée par une augmentation d'expression d'autres facteurs de transcription de la famille bHLH. Il s'agit notamment de l'expression de la neurogenine 2 (Neurog2) qui intervient dans les cellules de type 2 exprimant déjà Sox2 et Mash1 ainsi que dans les cellules de type 3 qui quant à elles,

expriment la protéine DCX (Hodge *et al.*, 2008 ; Roybon *et al.*, 2009). Cette étape est également marquée par la répression de l'expression du facteur REST qui semble être contrôlée par les facteurs de la famille bHLH et plus particulièrement NeuroD2 (Ravanpay *et al.*, 2010). L'avancée vers les stades plus en aval de la neurogenèse est marquée par l'augmentation de l'expression de NeuroD1 au niveau des cellules de type 2b exprimant la DCX. NeuroD1, dont la transcription est dépendante de la voie Wnt/b-caténine, intervient dans la différenciation et la survie des précurseurs neuronaux (Gao *et al.*, 2009). En effet, des animaux invalidés pour le gène NeuroD1 présentent uniquement quelques cellules différenciées en neurones granulaires. D'autres membres de la famille Sox sont ensuite impliqués dans le passage des neuroblastes aux neurones immatures comme Sox11 exprimé dans les TAPs mais ensuite réprimé dans les neurones immatures. Son rôle est de promouvoir la différenciation neuronale et ne semble pas intervenir dans la différenciation astrocytaire (Haslinger *et al.*, 2009).

La transformation en neurone mature est marquée par l'expression d'une protéine également dépendante de la voie Wnt/b-caténine, Prox1. Son expression est présente dès les stades tardifs des cellules de type 3, et jusque dans les neurones matures. Prox1 est nécessaire à la maturation et la survie des cellules nouvellement formées (Lavado *et al.*, 2011 ; Karalay *et al.*, 2011). Le facteur de transcription CREB est également impliqué dans la maturation neuronale et la survie en stimulant la pousse dendritique (Jagasia *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces données montre que le bon déroulement de la neurogenèse nécessite l'enchaînement de l'expression d'une multitude de facteurs de transcription afin de promouvoir la formation de nouveaux neurones ou de maintenir le pool de cellules souches. La neurogenèse peut être influencée par plusieurs paramètres : l'activité induite par d'autres neurones, le micro-environnement créé par les cellules voisines aux cellules souches ou encore par des stimuli externes.

b – La régulation dépendante de l'activité

L'hippocampe et plus particulièrement le DG possède un grand nombre d'inter-neurons GABAergiques qui produisent et libèrent du GABA. Les cellules nouvellement nées sont insensibles aux effets du GABA. Cependant, la formation de synapses GABAergiques les rend sensibles à la dépolarisation induite par le GABA et conduit ensuite à la formation de contacts glutamatergiques. Ces derniers permettent l'inversion de l'effet dépolarisant du GABA en effet hyperpolarisant, appelé le « switch » GABAergique, et constitue un signe de maturité neuronale (Esposito *et al.*, 2005).

Le GABA joue un rôle inhibiteur de la reprise de prolifération des cellules souches et des précurseurs. En effet, la suppression de la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur GABA induit une augmentation de la prolifération au niveau de la SGZ et la délétion de la sous-unité $\alpha 2$ altère la migration neuronale dans la GCL (Duveau *et al.*, 2011), indiquant ainsi que la signalisation GABAergique exerce un effet d'une part inhibiteur par rapport à la prolifération et d'autre part stimulant pour la mise en place structurelle des nouvelles cellules formées. Par ailleurs, l'apport de GABA provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, accompagnée d'une accumulation intracellulaire du facteur de transcription NeuroD et corrélée avec la différenciation neuronale (Tozuka *et al.*, 2005).

Dans la suite du processus de neurogenèse, le passage d'un neurone immature à un neurone mature est surtout marqué par l'extension des prolongements dendritiques. Lors de cette étape, il a été démontré que, chez la souris, l'administration d'un antagoniste GABAergique induisait une réduction de la longueur des dendrites et de la densité des épines dendritiques, ayant pour conséquence une limitation de l'intégration des nouvelles cellules dans le réseau neuronal pré-existant (Sun *et al.*, 2009). A l'inverse, un agoniste GABAergique augmente la longueur des dendrites des neurones chez la souris (Ge *et al.*, 2006). Ces éléments indiquent clairement que le GABA exerce un double rôle lors du processus

neurogénique dans l'hippocampe. D'une part, il permet de maintenir le pool de cellules souches en empêchant la reprise du cycle cellulaire, et d'autre part, il stimule la différenciation neuronale des cellules nouvellement nées lors des étapes plus tardives de la neurogenèse.

D'autres neurotransmetteurs sont impliqués dans la régulation de la neurogenèse. Lors de la synaptogenèse, qui précède le « switch » GABAergique, les premiers apports glutamatergiques excitateurs sont reçus par les nouvelles cellules formées (Ge *et al.*, 2006). Ces nouveaux neurones glutamatergiques deviennent alors pleinement fonctionnels, s'intègrent dans le réseau, et peuvent à leur tour réguler l'activité des interneurones qui eux même influencent la neurogenèse.

En plus des interneurones GABAergiques du DG, des interneurones cholinergiques innervent le DG. La suppression de ces neurones cholinergiques induit un déficit en neurogenèse conduisant à une réduction de nouvelles cellules (Cooper-Kuhn *et al.*, 2004).

Enfin le rôle de la sérotonine dans le processus neurogénique a également été avancé puisque la perturbation de la signalisation de la sérotonine au niveau de l'hippocampe impacte fortement la neurogenèse (Radley and Jacobs, 2002).

c – La régulation par les facteurs neurotrophiques

L'établissement d'une neurogenèse adulte nécessite une niche micro-environnementale dans laquelle se trouvent les signaux nécessaires au bon déroulement des différentes phases de ce processus. Parmi eux, les neurotransmetteurs, dont nous venons d'évoquer le rôle, et les facteurs neurotrophiques. Ces derniers sont des signaux extracellulaires qui permettent l'activation des voies de transduction intracellulaires pour aboutir à la reprise du cycle cellulaire jusqu'à la maturation et la survie neuronale. Nous pouvons distinguer 3 groupes de facteurs : les facteurs de croissance à action neurotrophique, les cytokines neurotrophiques et les neurotrophines.

- **Les facteurs de croissance à action neurotrophique : fibroblast growth factor (FGF) ; insulin-like growth factor (IGF) et vascular endothelial growth factor (VEGF).**

La famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) exerce non seulement une action sur le développement des fibroblastes mais également sur les neurones. Des études ont montré que l'injection intra-ventriculaire de FGF-2 accroissait la neurogenèse hippocampique alors que l'inactivation du gène codant son principal récepteur (FGFR-1) la réduisait (Rai *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2007).

Le facteur de croissance apparenté à l'insuline IGF-1 est impliqué dans la reprise du cycle cellulaire, puisque l'infusion intra-ventriculaire d'IGF stimule la neurogenèse adulte et l'inactivation du gène codant l'IGF-1 réduit le nombre de nouvelles cellules formées au niveau de l'hippocampe (Aberg *et al.*, 2000, 2003 ; Trejo *et al.*, 2008).

Le VEGF, facteur connu pour intervenir dans la régulation de l'angiogenèse, injecté en intra-ventriculaire, stimule également la prolifération cellulaire de l'hippocampe et promeut la survie neuronale (Jin *et al.*, 2002 ; Schanzer *et al.*, 2004). Cependant, le blocage de la signalisation VEGF n'affecte pas la neurogenèse basale sous-entendant un rôle non indispensable dans la régulation de la neurogenèse « physiologique » (Fabel *et al.*, 2003).

- **Les cytokines neurotrophiques : ciliary neurotrophic factor (CNTF) et l'interleukine-6 (IL-6).**

La cytokine neurotrophique CNTF accroît la prolifération des cellules souches neuronales au niveau de la SGZ, où elle provoque l'augmentation de la différenciation des précurseurs neuronaux exclusivement en neurones sans modifier la genèse des oligodendrocytes ou des astrocytes, suggérant un rôle unique de ce facteur dans la différenciation neuronale (Emsley and Hagg, 2003).

De manière surprenante, les cytokines pro-inflammatoires ont été impliquées dans la différenciation des cellules souches neuronales. En s'attachant à la forme soluble de son récepteur, l'IL-6 microgliale est capable d'activer la voie des MAPK et d'induire ainsi une différenciation neuronale et astrocytaire (Dominguez *et al.*, 2008 ; Islam *et al.*, 2009).

- **Les neurotrophines : nerve growth factor (NGF) ; brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ; neurotrophin-3, -4 et -5 (respectivement NT-3, NT-4 et NT-5).**

Les neurotrophines sont de loin les facteurs les plus étudiés pour leur action dans la régulation de la neurogenèse. Le NGF a été le premier à être découvert (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951 ; Aloe, 2011), et les autres membres de la famille des neurotrophines ont pu l'être sur la base de l'homologie de séquence avec le NGF. Le NGF accroît la survie neuronale dans l'hippocampe sans affecter la prolifération cellulaire (Frielingsdorf *et al.*, 2007) et promeut la prolifération et la différenciation cellulaire *in vitro* (Cattaneo and McKay, 1990).

L'invalidation du gène codant pour NT-3 produit une altération de la différenciation neuronale mais pas de la différenciation astrocytaire ni de la prolifération cellulaire (Shimazu *et al.*, 2006). En revanche, l'implication de NT-4 et NT-5 n'est pas clairement établie dans la neurogenèse hippocampique adulte, puisque l'invalidation du gène codant NT-4 ne modifie pas la neurogenèse induite par un environnement enrichi (Rossi *et al.*, 2006) et à ma connaissance aucune donnée n'est rapportée concernant NT-5.

De nombreuses études ont montré que le BDNF intervient dans la régulation de la différenciation et la survie neuronale. Nous verrons dans la partie suivante, les mécanismes intracellulaires qui permettent le contrôle de la neurogenèse. Nous apporterons ici des éléments prouvant que le BDNF est nécessaire au bon déroulement de la neurogenèse. Des souris hétérozygotes pour le gène du BDNF (BDNF^{+/-}) présentent une réduction de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse (Lee *et al.*, 2002a) et une restriction alimentaire

induit une augmentation de la neurogenèse hippocampique associée à une élévation de l'expression du BDNF (Lee *et al.*, 2002b). Lors d'un traitement avec des antidépresseurs, le BDNF semble être un acteur important de l'effet neurogénique de ces composés (Sairanen *et al.*, 2005). Néanmoins, des données rapportent que chez les souris mutées hétérozygotes BDNF^{+/-} ainsi que chez celles surexprimant la forme tronquée (donc inactive) du récepteur du BDNF, le TrkB, le traitement chronique avec un antidépresseur stimule la prolifération cellulaire hippocampique mais diminue la survie des cellules néoformées (Sairanen *et al.*, 2005). D'autres données ont mis en évidence que la potentialisation à long terme (LTP) peut promouvoir la prolifération, la maturation et la survie des nouvelles cellules créées dans l'hippocampe (Bruehl-Jungman *et al.*, 2006 ; Cho *et al.*, 2013) en induisant la libération de BDNF (Cho *et al.*, 2013). Le blocage de la signalisation TrkB lors de l'induction de la LTP inhibe son effet stimulant sur la neurogenèse (Cho *et al.*, 2013).

B – BDNF et contrôle de la plasticité

Outre la neurogenèse hippocampique pour laquelle le BDNF joue un rôle primordial, la plasticité fait également référence à la plasticité synaptique dans laquelle la potentialisation à long terme, évoquée dans la partie précédente, et considérée comme la base de la mémoire à long terme, induit probablement une libération de BDNF. Ce chapitre résume les différents mécanismes par lesquels l'expression du BDNF est induite et les mécanismes d'action de ce facteur neurotrophique.

1 – Expression du BDNF

L'organisation structurelle du gène du BDNF est complexe (Figure 17A). Ce gène possède 9 exons contrôlés chacun par un promoteur distinct, pouvant donner jusqu'à 24 transcrits (Boulle *et al.*, 2012). L'ensemble de ces transcrits sont traduits en une seule protéine mature, ce qui suggère de multiples niveaux de régulation de l'expression (Aid *et al.*, 2007).

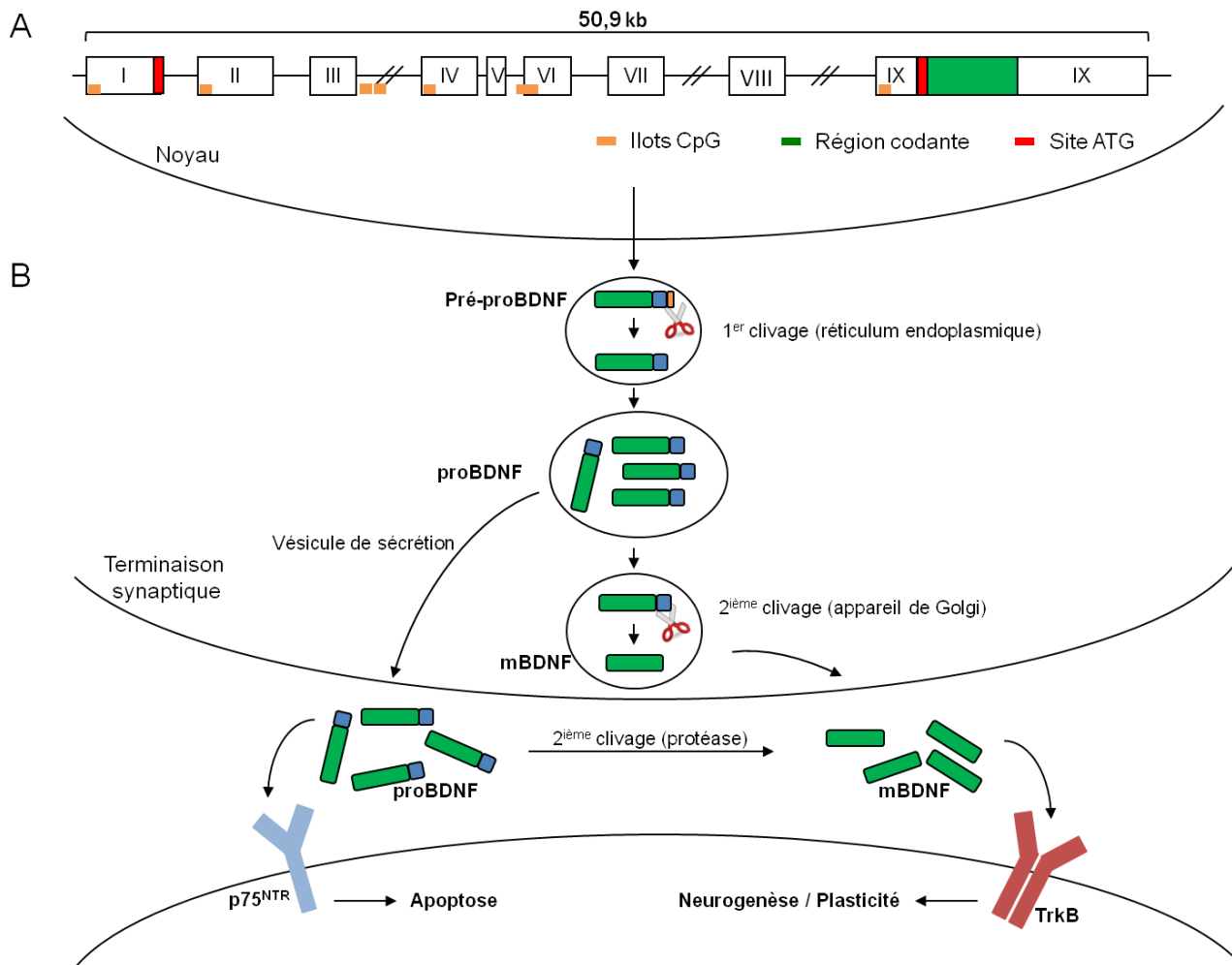


Figure 17. Schéma représentant la composition du gène du BDNF et sa synthèse.

(A) Les exons (de I à IX) sont représentés par des boîtes et les introns par des lignes. La taille totale du gène est d'environ 50,9 kb. Les boîtes rouges représentent l'emplacement des sites initiateurs de la traduction (ATG). La boîte verte au sein de l'exon IX représente la région codante pour la protéine BDNF. Les îlots CpG sont également représentés et ont été définis selon les critères évoqués dans la partie II - E, à savoir une taille comprise entre 0,3 et 3 000 bp ; un pourcentage de C et G supérieur à 50 % et un ratio de CpG observé / attendu supérieur à 0,6 (Adaptée de Boule *et al.*, 2012).

(B) Le BDNF est synthétisé sous forme d'un précurseur le pré-proBDNF. Il est clivé une première fois dans le réticulum endoplasmique en proBDNF. Le proBDNF peut être directement sécrété ou bien être clivé une deuxième fois dans l'appareil de Golgi en BDNF mature (mBDNF) avant d'être sécrété. Le proBDNF localisé dans la fente synaptique se lie au récepteur p75^{NTR} tandis que le mBDNF, provenant soit du compartiment cellulaire soit du clivage extracellulaire du proBDNF, se lie au TrkB.

La protéine BDNF est tout d'abord synthétisée comme précurseur : le pré-pro-BDNF, puis clivé une première fois en une protéine pro-BDNF de 32 kDa puis une seconde fois en une protéine mature de 14 kDa (Figure 17B). Le pro-BDNF et le BDNF sont toutes les deux des protéines actives dont la sécrétion est dépendante de l'activité. La sécrétion du BDNF est

induite par un influx calcique intracellulaire qui provient soit d'un compartiment intracellulaire (Griesbeck *et al.*, 1999) soit des récepteurs ionotropiques glutamatergiques et des canaux calciques voltage-dépendants (Hartmann *et al.*, 2001). Au-delà de permettre la sécrétion du BDNF, l'activité neuronale permet également de réguler le transport des messagers intracellulaires du BDNF et de la protéine jusqu'aux dendrites, mécanisme considéré comme responsable de la modulation de la transmission synaptique et de la synaptogenèse (Tongiorgi, 2008).

2 – La signalisation BDNF-TrkB

Les neurotrophines peuvent se lier à deux types de récepteurs pour exercer leurs effets : les récepteurs de la famille Trk (tropomyosin-related kinase) avec une haute affinité et le récepteur p75^{NTR} (p75 neurotrophin receptor) avec une faible affinité. Les voies intracellulaires dépendantes des Trks sont impliquées dans les mécanismes de différenciation cellulaire, de survie et de plasticité synaptique tandis que celles en aval de p75^{NTR} vont promouvoir la protéolyse et l'apoptose (Lu *et al.*, 2005) (Figure 17B).

Le récepteur de haute affinité du BDNF mature est le TrkB (ou NTRK2, neurotrophin tyrosine kinase receptor 2). Son activation par la liaison d'un homodimère de BDNF induit la dimérisation du récepteur et l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine 515 et 816 (Y515 et Y816) (Jing *et al.*, 1992 ; Cunningham and Greene, 1998). L'activation et le recrutement de protéines partenaires aux différents sites de phosphorylation conduit à l'activation de trois principales voies de signalisation :

- la phosphorylation d'Y515 active la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) qui promeut la différenciation neuronale et la croissance ;
- la phosphorylation d'Y515 active la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) qui promeut la survie cellulaire et la croissance ;

- la phosphorylation d'Y816 active la voie de la PLC γ (Phospholipase C γ) impliquée dans la plasticité synaptique et la neurotransmission (Musumeci *et al.*, 2009 ; Minichiello, 2009) (Figure 18).

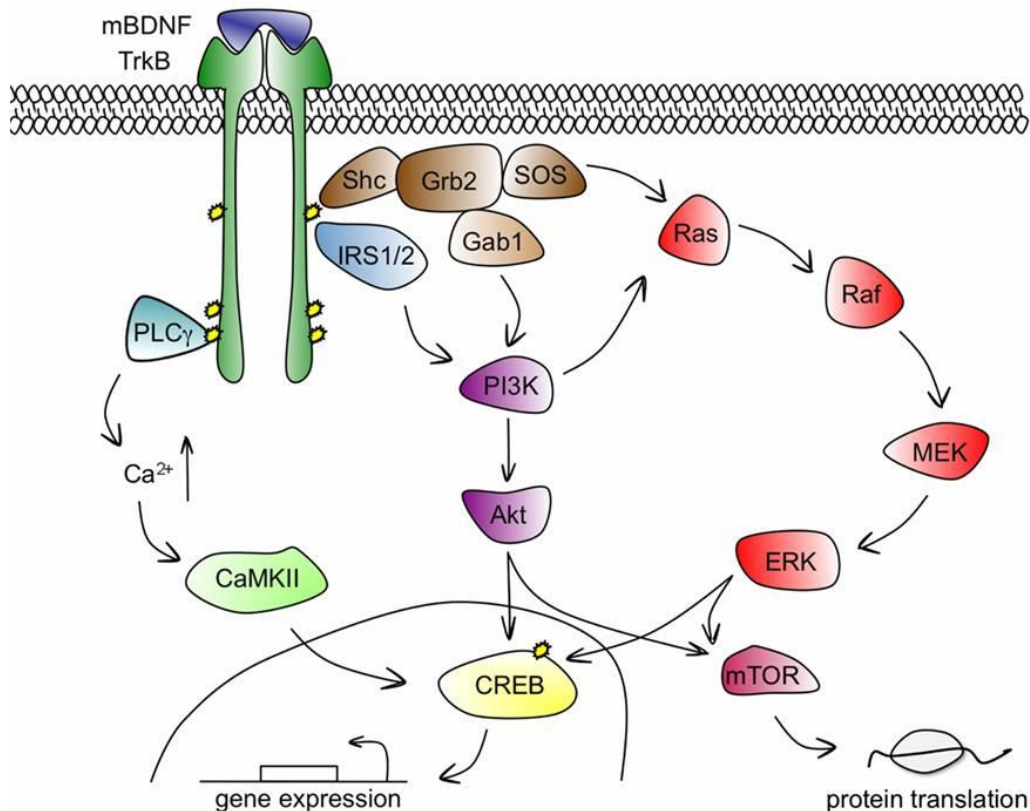


Figure 18. Schéma illustrant les voies de signalisation BDNF-TrkB. La liaison du BDNF mature (mBDNF) au TrkB induit l'auto-phosphorylation de celui-ci et conduit à l'activation des trois voies de signalisation MAPK, PI3K et PLC γ . L'ensemble de ces signalisations aboutit à l'activation de CREB par phosphorylation et ainsi contrôle la transcription des gènes cibles impliqués dans la différenciation, la survie et la plasticité. PLC γ , phospholipase C γ ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; CaMKII, calcium-calmodulin dependent kinase; Shc, src homology domain containing; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; SOS, son of sevenless; Gab1, Grb-associated binder 1; IRS1/2, insulin receptor substrates 1/2; CREB, cAMP-calcium response element binding protein; Ras, GTP binding protein; Raf, Ras associated factor; MEK, MAP/Erk kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin (Adaptée de Cunha *et al.*, 2010).

L'activation des différentes voies de signalisation conduit à la phosphorylation de CREB lui permettant ainsi de recruter CBP qui induit la transcription des gènes cibles, notamment les gènes neuronaux. Les voies des MAPK et de PI3K induisent l'activation de

mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui accroît l'initiation de la traduction des ARN messagers en protéines (Figure 18).

Le deuxième récepteur impliqué dans la régulation des effets du BDNF est le p75^{NTR}. Ce récepteur est ambivalent et peut activer des signalisations différentes afin de produire deux types de réponse cellulaire. Il peut, en liant le pro-BDNF (Teng *et al.*, 2005), induire une mort cellulaire par l'activation de la voie TRAF (TNF (tumor necrosis factor)-receptor-associated factors) ou encore NADE (neurotrophin-associated cell death executor). Le p75 peut également se dimériser avec les récepteurs de la famille Trk et ainsi accroître les signalisations en aval (Lu *et al.*, 2005).

3- BDNF et LTP

La potentialisation à long terme (LTP) est la forme de plasticité synaptique la plus étudiée et est considérée comme un modèle cellulaire responsable des mécanismes d'apprentissage et de mémoire. La première mise en évidence du rôle des neurotrophines dans la plasticité synaptique a été apportée dans les années 90 où il a été montré que ces molécules pouvaient provoquer un potentiel d'action et une LTP au niveau de l'hippocampe et que cette induction de plasticité était reliée à l'activation des récepteurs Trk (Kafitz *et al.*, 1999, Kang and Schuman, 1995).

La fonction du BDNF dans le développement de la LTP a été clairement établie à l'aide de lignées de souris mutantes pour le BDNF. Sur des tranches d'hippocampe, la déficience en BDNF des souris hétérozygotes (BDNF^{+/-}) provoque un déficit dans l'induction de la LTP au niveau des synapses que les collatérales de Schaffer font avec CA1, et le traitement avec du BDNF exogène permet d'inverser ces déficits, suggérant que celui-ci participe à la régulation de l'induction de la LTP (Korte *et al.*, 1995 ; Patterson *et al.*, 1996). Par la suite, l'implication du BDNF dans la LTP a été clairement démontrée par la nécessité

de l'activation de TrkB lors de stimulations « theta-burst » (Guo *et al.*, 2014). Par ailleurs, le blocage du récepteur TrkB induit une suppression de la plasticité synaptique induite par des inductions répétées de LTP (Sakuragi *et al.*, 2013). En outre, les voies de signalisation en aval du BDNF sont de même nécessaires à la LTP puisque, sur des tranches d'hippocampe de souris, la PLC γ et ERK sont indispensables pour la générer (Patterson *et al.*, 2001 ; Minichiello *et al.*, 2002) et l'activation de la CaMKII par la LTP permet le renforcement synaptique (Guo *et al.*, 2014 ; Lisman *et al.*, 2012).

A côté de l'effet stimulant du BDNF sur la LTP, l'activation préférentielle du récepteur p75^{NTR} par le pro-BDNF chez la souris semble, à l'inverse, altérer la densité des épines dendritiques nécessaires à la plasticité synaptique, conduisant alors à une diminution de la LTP et un accroissement de la dépression à long-terme (LTD) (Yang *et al.*, 2014). Le clivage du pro-BDNF en BDNF mature serait également indispensable au développement de la LTP et notamment à la phase tardive de celle-ci (Pang *et al.*, 2004). De plus, lors d'inductions répétées de LTP, le blocage du récepteur p75^{NTR} induit un accroissement encore plus important du développement synaptique, incluant le nombre d'épines dendritiques et le renforcement synaptique (Sakuragi *et al.*, 2013).

Nous avons évoqué précédemment que la signalisation contrôlée par le p75^{NTR} aboutissait à l'activation de voies apoptotiques et que inversement, les signalisations du récepteur TrkB conduisaient à la promotion de la survie et de la plasticité synaptique. Ici, nous retrouvons un rôle stimulateur du BDNF par le TrkB, et répresseur du pro-BDNF par le récepteur p75^{NTR} pour la LTP. L'ensemble de ces données mettent en évidence le « yin and yang » du BDNF, et plus généralement des facteurs neurotrophiques, montrant que la maturation de ces facteurs participe au développement de la plasticité tandis que leurs précurseurs dirigent les cellules vers l'apoptose (Lu *et al.*, 2005). Son rôle dans la régulation

de la plasticité synaptique et la LTP, suggère vivement que le BDNF est impliqué dans les processus mnésiques régulés par ces formes de plasticité.

4- BDNF et mémoire

Le rôle du BDNF dans les processus mnésiques a été établi *in vivo* par des investigations montrant que l'expression des messagers du BDNF était augmentée dans l'hippocampe de rats après des entraînements faisant intervenir des mémoires hippocampe-dépendantes (piscine de Morris ou encore conditionnement contextuel à la peur) (Hall *et al.*, 2000 ; Kesslak *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'injection intra-hippocampique de BDNF améliore les performances mnésiques des rats dans la piscine de Morris alors que, inversement, des injections d'anticorps anti-BDNF provoquent leur détérioration (Mu *et al.*, 1999 ; Cirulli *et al.*, 2004). De même, des animaux conditionnellement invalidés pour le gène du BDNF ou du récepteur TrkB présentent une altération de la mémoire et de l'apprentissage hippocampe-dépendants ainsi que de la LTP (Monteggia *et al.*, 2004 ; Minichiello *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données montre que le BDNF ainsi que son récepteur, donc la signalisation BDNF-TrkB, sont directement impliqués dans ces processus mnésiques. De plus, le BDNF exerce un rôle dans le maintien de la mémoire après la période d'apprentissage : ainsi l'injection d'un anticorps anti-BDNF après une phase d'entraînement, dans le test du conditionnement contextuel à la peur, bloque la rétention de la mémoire (Bekinschtein *et al.*, 2007). De plus, l'injection de BDNF permet d'inverser les effets sur la mémoire du blocage de la synthèse protéique durant cette même période (Bekinschtein *et al.*, 2008). Ces dernières données suggèrent qu'une nouvelle synthèse de BDNF est nécessaire et suffisante dans la régulation des processus de consolidation mnésique.

Le niveau d'expression du BDNF lors des phases d'apprentissage, de consolidation de la mémoire ainsi que dans la régulation de la LTP semble déterminant. La surexpression du

BDNF mature chez des souris modifiées génétiquement induit des déficits de la mémoire de travail (Papaleo *et al.*, 2011) ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale à court terme (Cunha *et al.*, 2009). Néanmoins, la surexpression de la forme entière du récepteur TrkB induit l'amélioration des performances mnésiques dans la piscine de Morris (Koponen *et al.*, 2004a) qui serait associée à une augmentation de la signalisation intracellulaire dépendante du TrkB (Koponen *et al.*, 2004b). De même, une surexpression de la forme tronquée du récepteur TrkB chez la souris induit des déficits de la mémoire spatiale (Saarelainen *et al.*, 2000). Ces résultats indiquent qu'une fine régulation de l'expression du BDNF et donc de l'activation de la signalisation en aval du TrkB, est nécessaire au bon déroulement des processus comportementaux qui en découlent.

L'induction et le maintien de la LTP, l'apprentissage ainsi que la consolidation de la mémoire nécessitent des changements structuraux au niveau des synapses mises en jeu durant ces différents processus. Ces changements structuraux incluent la formation de nouvelles épines dendritiques, la disponibilité des récepteurs, l'augmentation du nombre de branchements et de dendrites ainsi qu'une augmentation de la longueur de celle-ci. Le BDNF, en tant que facteur trophique participe à l'ensemble de ces modifications et régule les mécanismes sous-jacent à la gestion des processus plastiques nécessaires aux phénomènes mnésiques (Cowansage *et al.*, 2010).

C – La neurogenèse et la mémoire

Le rôle de la neurogenèse hippocampique n'est pas encore complètement établi, mais ce processus, dont l'étude est relativement récente, a tout d'abord été décrit comme jouant un rôle prépondérant dans la mémoire. Néanmoins, la neurogenèse hippocampique n'est pas impliquée dans tous les types de mémoire. L'ablation de ce processus à l'aide de rayons X induit des déficits observés dans le test du conditionnement contextuel à la peur mais pas dans

les performances spatiales étudiées dans le test de la piscine de Morris (Shors *et al.*, 2002, Saxe *et al.*, 2006). Dans le test du conditionnement à la peur, cette ablation altère les performances seulement dans un protocole avec un seul essai, où les animaux sont directement exposés au contexte associé à un stimulus aversif, mais pas lorsqu'il y a une phase d'entraînement où ils sont pré-exposés au contexte (Drew *et al.*, 2010). Ces données sous-entendent un rôle des nouveaux neurones produits au niveau du gyrus denté dans les processus d'apprentissage.

Sur les milliers de nouveaux neurones ajoutés à l'hippocampe adulte chaque jour, seulement moins de la moitié survivent. Au niveau comportemental, les entraînements qui font intervenir la mémoire hippocampique liée à la localisation spatiale induisent une augmentation de la survie des cellules néoformées (Drapeau *et al.*, 2003). Cependant, ce n'est pas l'entraînement par lui-même qui influence la survie de ces cellules mais l'apprentissage de la tâche à accomplir. Cette distinction entre entraînement et apprentissage a été mise en évidence par des études montrant que les animaux réussissant à acquérir une réponse conditionnée (par exemple, la reconnaissance de l'emplacement de la plateforme immergée dans le test de la piscine de Morris) présentent une augmentation de la survie et de la maturation de cellules nouvellement nées, alors que ceux échouant à acquérir cette compétence mais subissant le même entraînement n'ont pas d'augmentation de survie des cellules néoformées (Sisti *et al.*, 2007 ; Dalla *et al.*, 2007 ; Epp *et al.*, 2011). Les nouvelles cellules recrutées et impliquées dans l'apprentissage d'une tâche sont âgées de 1 à 2 semaines et ce sont ces mêmes cellules qui seront préférentiellement réactivées en cas de ré-exposition au contexte (Trouche *et al.*, 2009 ; Anderson *et al.*, 2011).

Des études récentes ont montré que la neurogenèse hippocampique était directement impliquée dans un processus mnésique particulier, la flexibilité cognitive. La flexibilité cognitive est définie comme la capacité à utiliser de manière flexible et/ou à ignorer les

associations habituelles lorsque les évènements et/ou l'environnement changent. En d'autres termes, la flexibilité cognitive permet la mise à jour des informations déjà encodées afin de s'adapter à la nouvelle situation. Des études ont montré que la suppression de la neurogenèse hippocampique conduisait à des altérations de l'utilisation des informations spatiales dans la piscine de Morris (Garthe *et al.*, 2009). Les cellules néoformées dans l'hippocampe sont également responsables des changements de réponses à un stimulus faisant appel à une mémoire antérieure, autrement dit elles sont nécessaires à la suppression des informations devenues non essentielles (Burghardt *et al.*, 2012 ; Garthe *et al.*, 2014).

Le rôle fonctionnel de la neurogenèse adulte se dessine peu à peu. De grandes quantités d'informations provenant des aires corticales convergent vers le cortex enthorinal et puis rejoignent le DG puis CA3. Il existe de plus des entrées directes du cortex enthorinal vers CA3 s'ajoutant ainsi à celles provenant du DG. Les capacités de stockage de CA3 sont néanmoins limitées, et il semble que la fonction la plus généralement attribuée au DG est un rôle de régulation des informations lui arrivant afin de les rendre aptes au traitement dans CA3 et ne pas interférer avec les mémoires plus anciennes (Rolls, 2010 ; Wiskott *et al.*, 2006 ; Winocur *et al.*, 2012).

Dans des tâches spatiales, les pics d'activités des cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe sont fortement corrélés avec la place de l'animal dans une zone d'expérimentation ce qui sous tend l'existence de cellules de place (Shapiro *et al.*, 1997) ainsi que le concept de carte cognitive dans l'hippocampe. Afin d'éviter des interférences entre des informations concernant des contextes qui peuvent être similaires mais néanmoins différents, informations qui font appel à un motif d'activation spécifique, le DG jouerait un rôle de filtre et d'organisation des nouvelles données. Le DG bloquerait ces interférences à l'aide des nouvelles cellules formées qui seraient impliquées dans l'encodage des nouveaux contextes

(Garthe and Kempermann, 2013) et pourraient jouer un rôle d'« horodatage » des informations (Kempermann, 2012).

La production de nouveaux neurones permet d'acquérir des nouvelles informations provenant de l'environnement. De plus, la survie de ces cellules permet leur intégration au réseau neuronal du DG mais également de CA3 en émettant des prolongements lorsque l'individu est entraîné et/ou ré-entraîné. De nouvelles connections se créent entre l'ancien réseau et ces cellules, un réseau plus complexe qui permettra par la suite d'intégrer des nouvelles informations, elles aussi plus complexes, faisant apparaître alors un réseau neuronal plus efficace pour de futurs apprentissages (Aimone *et al.*, 2009).

D – L'éthanol et l'hippocampe

1 – La neurogenèse et l'éthanol

La consommation de grandes quantités d'alcool conduit inévitablement à une perte significative du volume des régions corticales et sous-corticales, accompagnée de déficits cognitifs (Oscar-Berman and Marinkovic, 2003 and 2007 ; Beresford *et al.*, 2006). De façon surprenante, l'abstinence suite à une consommation chronique d'alcool est associée à une récupération du volume cérébral ainsi qu'à l'amélioration de la cognition à plus ou moins long terme (Pfefferbaum *et al.*, 1995 ; Sullivan *et al.*, 2000). L'utilisation de modèles animaux exposés à de grande quantité d'alcool a permis de montrer que, chez l'adulte, les principaux dommages cérébraux induits par l'éthanol sont localisés au niveau des structures limbiques, notamment l'hippocampe et plus particulièrement le DG. La consommation d'éthanol induit principalement une dégénérescence cellulaire par nécrose (Obernier *et al.*, 2002b) et une réduction de la neurogenèse (Nixon and Crews, 2002) associée aux déficits cognitifs, mais l'abstinence entraîne une augmentation (rebond) spectaculaire de cette neurogenèse (Pfefferbaum *et al.*, 2008 ; Nixon and Crews, 2004 ; Obernier *et al.*, 2002a). Des études ont

monté que l'exposition à l'éthanol induisait une altération des capacités des NSCs *in vitro* à former des colonies, à proliférer, se différencier et survivre (Hao *et al.*, 2003a,b ; Tatenio *et al.*, 2005). Une inhibition de la prolifération des NSCs ainsi qu'une réduction de la survie des progéniteurs neuronaux et de l'arborisation dendritique ont également été rapportées *in vivo* (Jang *et al.*, 2002a,b ; He *et al.*, 2005 ; Herrera *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données indiquent que l'éthanol inhibe la neurogenèse contribuant ainsi à la neuro-dégénération par une perte de production de nouvelles cellules (Nixon *et al.*, 2006).

2 – Le BDNF et l'éthanol

La consommation chronique d'alcool chez l'humain induit une diminution de la concentration plasmatique de BDNF (Joe *et al.*, 2007). Dans les modèles animaux, les données sur l'expression du BDNF dans l'hippocampe dans le cadre de la consommation ou de l'exposition à l'éthanol sont contradictoires. Des études ont observé dans l'hippocampe :

- une diminution chez le rat après une exposition chronique à l'éthanol (Mac Lennan *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2004) ;
- aucune modification chez le rat ou la souris après administration, exposition ou consommation chronique (Okamoto *et al.*, 2006 ; Miller *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2000 ; McGough *et al.*, 2004) ;
- une augmentation après une injection ou une exposition chronique (McGough *et al.*, 2004 ; Miller, 2004 ; Tapia-Arancibia *et al.*, 2001).

Ce désaccord de la littérature au regard de l'expression du BDNF peut être expliqué par le choix du modèle utilisé, la méthode d'alcoolisation employée, la durée de l'exposition à l'éthanol, l'inclusion ou non d'une période sans présence d'alcool avant les analyses. Il est donc difficile de conclure sur une action simple et uniforme de l'éthanol sur l'expression du BDNF. Néanmoins, une hypothèse concernant la durée de l'exposition paraît envisageable. Il

semble qu'une durée d'exposition courte pourrait induire une augmentation de l'expression du BDNF (McGough *et al.*, 2004 ; Miller, 2004) permettant probablement de compenser les effets neurotoxiques de l'éthanol sur l'hippocampe, mécanisme qui échouerait lors de la prolongation de l'exposition à l'éthanol (McGough *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2004).

3 – Les signalisations du BDNF et l'éthanol

Comme l'expression du BDNF est affectée de façon positive ou négative par la consommation d'éthanol, il est logique que les signalisations intracellulaires dépendantes de l'activation du TrkB soient également altérées.

L'activation de la voie de signalisation ERK (cf. III – B – 2) est critique pour les processus mnésiques (Kelly *et al.*, 2003). Une exposition chronique à l'éthanol chez le rat induit une diminution de l'activation de ERK dans l'hippocampe (Sanna *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2012) et une exposition aiguë semble réduire de façon dose spécifique cette activation au niveau du gyrus denté chez la souris (Spanos *et al.*, 2012) et chez le rat (Chandler and Sutton, 2005). L'abstinence suite à l'exposition chronique d'alcool induit une forte augmentation de la phosphorylation de ERK dans l'hippocampe de rat (Bertotto *et al.*, 2011 ; Sanna *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2012). L'éthanol, en exposition aiguë ou chronique, semble donc réduire l'activation de ERK dans l'hippocampe ce qui pourrait être une des causes de la détérioration des capacités cognitives induite par une exposition à l'éthanol.

Dans l'hippocampe, une autre voie beaucoup moins étudiée est celle aboutissant à l'activation de AKT qui exerce un rôle dans la survie neuronale (cf. III – B – 2). L'exposition aiguë à l'éthanol *in vitro* induit une diminution de la phosphorylation de AKT, qui participerait à l'entrée des cellules en apoptose (Akbar *et al.*, 2006). *In vivo*, la situation semble plus complexe puisque l'exposition aiguë à l'éthanol induit une augmentation d'activité de AKT dans l'hippocampe de rats non éthanol-préférant alors qu'aucune

modification n'est observée chez les rats éthanol-préférant (Nuutinen *et al.*, 2011). L'éthanol *in vitro* induirait donc une mort cellulaire en inhibant l'activation de AKT, mais cependant, des mécanismes adaptatifs vis-à-vis des effets délétères de l'éthanol pourraient se mettre en place pour les contrecarrer notamment chez des animaux non-préférant.

Une des voies de signalisation impliquée dans la plasticité synaptique et la neurotransmission fait intervenir la protéine PLC γ et en aval CaMKII (cf. III – B – 2). Cette dernière est activée par une augmentation de calcium intracellulaire. La consommation chronique d'éthanol chez le rat induit une diminution de la phosphorylation de CaMKII dans l'hippocampe et plus particulièrement dans CA1 et le DG (Wang *et al.*, 2012), suggérant une baisse de la neurotransmission. A l'inverse, l'abstinence suite à cette consommation chronique élève l'activité de cette protéine comparée à son niveau basal de phosphorylation (Wang *et al.*, 2012). L'activation de la PLC γ , permise par l'autophosphorylation du TrkB conduisant en aval à l'activation de la CaMKII par le calcium, est nécessaire à la sécrétion des neurotrophines (Canossa *et al.*, 2001). La sécrétion des neurotrophines est également contrôlée par les récepteurs du glutamate et nécessite en partie l'activation de la PLC γ (Canossa *et al.*, 2001). Il est donc logique de penser que la perturbation de la signalisation PLC-CaMKII est altérée par l'exposition à l'éthanol, conduisant alors à la baisse de la neurotransmission glutamatergique et donc à l'hyperexcitabilité cellulaire lors de l'abstinence (cf. I – C – 2).

L'ensemble des signalisations intracellulaires dépendantes de l'activation du TrkB et donc de l'expression du BDNF, converge vers un effecteur commun, le facteur de transcription CREB (cf. III – B – 2) qui lui même est lié aux effets induits par la prise d'éthanol par son action exercée dans la transcription génique. Les régulations de CREB impliquées dans les conséquences comportementales d'une exposition à l'alcool se situent non seulement dans l'hippocampe, mais aussi dans d'autres structures.

L'implication de CREB dans la régulation des effets cellulaires et comportementaux de la prise d'éthanol a été particulièrement étudiée dans l'amygdale et le noyau accumbens. Il a été montré que CREB est modulé par l'éthanol et qu'inversement il contrôle la consommation d'éthanol. Ainsi, chez la souris, l'haplodéficiency de CREB induit un phénotype de type anxieux associé à une plus grande consommation d'éthanol (Pandey *et al.*, 2004). De plus, chez des rats alcool-préférant, l'expression et l'activation de CREB sont diminuées (Pandey *et al.*, 1999), et le niveau de son expression est corrélée au degré de consommation (Pandey *et al.*, 2005). Ces informations suggèrent qu'un déficit dans l'expression et l'activation de CREB prédispose à une prise d'éthanol plus grande. L'hypothèse moléculaire établie par Moonat et ses collaborateurs (2010) suppose que dans l'amygdale, une exposition aiguë augmente l'activation de CREB tandis qu'une consommation chronique maintient un niveau basal de cette activation. L'abstinence après une consommation chronique provoquerait une chute importante de la phosphorylation conduisant ainsi à promouvoir la prise d'éthanol (Moonat *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires dans le noyau accumbens suivent le même modèle que dans l'amygdale. Une exposition chronique ainsi qu'une consommation volontaire diminuent la phosphorylation de CREB (Li *et al.*, 2003 ; Misra *et al.*, 2001) tandis qu'une période d'abstinence mène à une augmentation de son activation (Li *et al.*, 2003). Chez les souris de la lignée C57BL/6J, les niveaux d'expression et de phosphorylation de CREB dans le noyau accumbens sont inférieurs à ceux des souris DBA/2J (Misra and Pandey, 2003), confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle des faibles niveaux de phosphorylation de CREB seraient en partie responsables d'une consommation excessive d'alcool.

In vitro, l'exposition à l'éthanol induit une diminution de l'activité de CREB sur des neuroblastomes différenciés humains, et cette diminution est associée à la sécrétion du BDNF

et à une cytotoxicité. Cette dernière est prévenue par l'application exogène de BDNF suggérant un effet neuroprotecteur de la signalisation CREB (Sakai *et al.*, 2005).

In vivo, chez la souris comme chez le rat, l'injection aiguë d'éthanol diminue l'activité de CREB dans l'hippocampe (Soares-Simi *et al.*, 2014, Chandler and Sutton, 2005). Le développement de la tolérance aux effets de l'éthanol serait corrélé à une augmentation de phosphorylation de CREB dans cette région (Yang *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données indiquent que l'éthanol induit l'inhibition de l'activité des signalisations ERK, AKT et CaMKII aboutissant à une réduction probable des mécanismes de neurogenèse et de plasticité par une diminution de la transcription génique dépendante de CREB (cf. III – B – 2).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les données bibliographiques que nous venons d'exposer montrent que l'éthanol affecte les mécanismes de régulation épigénétique d'une part, et la neuroplasticité hippocampique d'autre part. Ces deux paramètres sont très certainement reliés aux mécanismes adaptatifs provoqués par une exposition à l'alcool et impliqués dans la dépendance à l'alcool. Chez les souris de la lignée C57BL/6J, la consommation d'alcool induit une augmentation de prolifération cellulaire dans l'hippocampe, et cette réactivité inverse de celle attendue est très peu étudiée. Les travaux réalisés pendant cette thèse avaient pour but de comprendre et d'élucider, au moins en partie, les mécanismes mis en œuvre chez les souris C57BL/6J sous-tendant la stimulation neuroplastique liée à la consommation d'alcool.

Nous nous sommes intéressés aux effets d'une prise chronique d'éthanol en libre choix sur les modifications épigénétiques dans l'hippocampe des souris C57BL/6J en nous concentrant d'abord sur les modifications post-traductionnelles des histones. Ces souris présentant une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté, nous avons analysé l'expression du facteur neurotrophique BDNF et les régulations épigénétiques sur ce gène. Nous avons étudié l'état de la neurogenèse hippocampique et cherché quel pouvait être le mécanisme de régulation de la plasticité impliqué lors de la consommation chronique d'éthanol en libre choix, en utilisant un composé pharmacologique, l'ANA-12, ciblant la signalisation BDNF-TrkB (Article 1).

Nous avons poursuivi l'étude des régulations épigénétiques induites par la consommation d'éthanol sur le gène du BDNF, en analysant son profil de méthylation dans les différentes sous-régions de l'hippocampe. Nous avons étudié l'effet de la surexpression du BDNF sur les signalisations intracellulaires dépendantes de l'activation du récepteur TrkB,

qui jouent un rôle dans la régulation de la plasticité. Enfin, nous nous sommes penchés sur les effets fonctionnels de la consommation chronique d'éthanol chez les souris C57BL/6J en étudiant un mécanisme de la plasticité synaptique, la LTP hippocampique, et en analysant les conséquences comportementales (Article 2).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE 1

Ethanol-induced epigenetic regulations at *Bdnf* gene in C57BL/6J mice

Emilien Stragier, Renaud Massart, Marine Salery, Michel Hamon, David Geny,
Vincent Martin, Fabien Boulle et Laurence Lanfumey

Molecular Psychiatry, 2014, Apr 29. doi: 10.1038/mp.2014.38. [Epub ahead of print]

Les conséquences épigénétiques et neuroplastiques de la consommation chronique d'éthanol chez les souris C57BL/6J

Au cours des rappels bibliographiques, nous avons vu que la consommation chronique d'alcool provoque une neurodégénérescence cérébrale conduisant à des déficits cognitifs. Une des structures cérébrales impliquées dans les processus mnésiques et sensibles aux effets de l'alcool est l'hippocampe. Cette première étude s'est penchée sur les conséquences épigénétiques et neuroplastiques de la consommation chronique d'éthanol dans une procédure de libre choix sur l'hippocampe des souris C57BL/6J.

L'étude des modifications épigénétiques dans l'hippocampe a révélé que l'expression génique des HDACs, responsables de la désactylation des histones, était globalement diminuée à la suite de la prise chronique et volontaire d'éthanol. Au niveau des modifications post-traductionnelles des histones dans l'hippocampe des souris « eau » et « éthanol », nous avons montré que l'acétylation de l'histone H4 (H4Ac), la diméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2) ainsi que la triméthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) étaient significativement augmentées dans le gyrus denté chez les souris « éthanol » comparées aux souris « eau ». De plus, H3K4me3 était également significativement augmentée dans CA3. Ces données suggèrent donc un remaniement chromatinien global entraîné par la consommation d'éthanol.

Chez les souris C57BL/6J, la prise chronique et volontaire d'alcool provoque une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté de l'hippocampe. Nous nous sommes donc intéressés aux facteurs pouvant être responsables de ces modifications de plasticité induites par l'éthanol. La consommation d'éthanol chez les souris C57BL/6J engendre une augmentation de l'expression génique du BDNF dans l'hippocampe, ainsi que la hausse de certains des facteurs de transcription appartenant à la famille bHLH, dont le rôle

dans les processus de prolifération est aussi bien établi. Afin de déterminer quels étaient les mécanismes mis en jeu dans cette stimulation, une analyse plus en profondeur du gène du BDNF a été réalisée et nous avons pu mettre en évidence une expression différentielle des exons composants ce gène. Ces modifications sont probablement dues à un remodelage important de la chromatine impliquant H3Ac et H3K4me3. Les modifications épigénétiques observées sur le gène du BDNF, provoquent des altérations dans l'expression de ces exons, et conduisent à une augmentation de l'expression protéique du BDNF à la fois au niveau du gyrus denté et de l'hilus de celui-ci.

L'analyse structurelle de l'hippocampe après la consommation chronique et volontaire d'éthanol a permis de confirmer une augmentation de prolifération ainsi qu'une augmentation de la survie cellulaire dans le gyrus denté. L'analyse phénotypique des cellules néoformées a montré que l'éthanol n'altérait pas la différenciation des cellules. Le pourcentage de production de neurones chez les souris « eau » et « éthanol » était le même, ce qui nous a permis de conclure que la consommation chronique et volontaire d'éthanol chez les souris C57BL/6J stimule la neurogenèse de l'hippocampe.

Dans le but de mieux déterminer le rôle du complexe BDNF/TrkB dans l'augmentation de la neurogenèse induite par l'éthanol, nous avons utilisé un antagoniste du récepteur TrkB récemment développé grâce à une collaboration avec le Dr. D. Rognan (Strasbourg, ANR BDNFarmood). Nous avons observé que le blocage du récepteur TrkB ne modifiait pas la prise d'éthanol, mais était suffisant pour inhiber la neurogenèse induite par la prise d'éthanol sans modifier la neurogenèse basale.

En conclusion, l'augmentation de neurogenèse hippocampique induite par l'éthanol chez les souris C57BL/6J est directement liée à la stimulation de l'expression du BDNF rendu possible, au moins en partie, par les modifications épigénétiques sur son gène.



ORIGINAL ARTICLE

Ethanol-induced epigenetic regulations at the *Bdnf* gene in C57BL/6J miceE Stragier^{1,2,3}, R Massart^{1,4}, M Salery^{1,3}, M Hamon^{1,3}, D Geny¹, V Martin^{1,2,3}, F Boule^{1,2,3,5} and L Lanfumey^{1,3}

High ethanol intake is well known to induce both anxiolytic and anxiogenic effects, in correlation with chromatin remodeling in the amygdaloid brain region and deficits in cell proliferation and survival in the hippocampus of rodents. Whether only moderate but chronic ethanol intake in C57BL/6J mice could also have an impact on chromatin remodeling and neuroplasticity was addressed here. Chronic ethanol consumption in a free choice paradigm was found to induce marked changes in the expression of genes implicated in neural development and histone post-translational modifications in the mouse hippocampus. Transcripts encoding neural bHLH activators and those from *Bdnf* exons II, III and VI were upregulated, whereas those from *Bdnf* exon VIII and *Hdacs* were downregulated by ethanol compared with water consumption. These ethanol-induced changes were associated with enrichment in both acetylated H3 at *Bdnf* promoter PVI and trimethylated H3 at PII and PIII. Conversely, acetylated H3 at PIII and PVIII and trimethylated H3 at PVIII were decreased in ethanol-exposed mice. In parallel, hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and TrkB-mediated neurogenesis in the dentate gyrus were significantly enhanced by ethanol consumption. These results suggest that, in C57BL/6J mice, chronic and moderate ethanol intake produces marked epigenetic changes underlying BDNF overexpression and downstream hippocampal neurogenesis.

Molecular Psychiatry advance online publication, 29 April 2014; doi:10.1038/mp.2014.38

INTRODUCTION

Chronic alcohol abuse is well known to cause neurodegeneration in both human and rodent brains, leading to severe cognitive impairments such as those observed in the Korsakoff's syndrome in humans, and to a marked reduction of hippocampal neurogenesis in rodents.¹ The hippocampus, a brain structure strongly associated with emotional control, memory and learning, is especially sensitive to ethanol withdrawal-induced seizures² and to ethanol-induced deficits in cell proliferation and survival within the subgranular zone of the dentate gyrus (DG).^{1,3} Hippocampal cell proliferation and survival are under the control of trophic factors such as fibroblast growth factor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).⁴ Interestingly, heterozygous *Bdnf*^{+/-} mice show a lower rate of cell proliferation as compared to wild-type mice⁵ and the loss of the high-affinity BDNF receptor TrkB, or its inactivation by overexpression of its truncated form, were found to induce a decrease in neural stem cell proliferation within the hippocampus,^{6,7} strongly suggesting that BDNF-TrkB signaling pathways have a key role in neurogenesis. In addition to trophic factors, neurogenesis also implicates specific neural genes, notably those of the bHLH transcription factor family that are both expressed sequentially during this process and controlled, in part, by epigenetic mechanisms.^{8,9}

Recent studies have demonstrated the importance of epigenetic factors in the regulation of neural stem cell differentiation^{10,11} and brain maturation¹² as well as in neuronal phenotype maintenance.^{13,14} In particular, enzymes controlling DNA methylation, and proteins interacting with methylated DNA such as

methyl CpG-binding protein 2, are clearly implicated in neural plasticity.¹⁵

Post-translational modifications of histones have also been shown to account for neuroplasticity-associated changes in neural gene expression. Interestingly, ethanol was found to induce marked changes in the activity of histone deacetylases (HDAC) and downstream histone acetylation,^{16,17} thereby suggesting that histone-dependent epigenetic regulation might also underlie ethanol-induced BDNF-mediated neuroplastic phenomena in the hippocampus. Indeed, histone-dependent epigenetic alterations were found in close association with ethanol-induced neuronal death and neurogenesis deficiency in rodents with low preference for ethanol. This is notably the case for rats, either 1 month after a 4-day binge-drinking paradigm¹⁸ or after a 7-week-exposure to ethanol vapor,¹⁹ and DBA/2J mice under a free choice ethanol paradigm.²⁰ In contrast, in C57BL/6J mice displaying a consistent high ethanol preference, voluntary ethanol consumption was found to unalter²¹ or even stimulate^{20,22} neural stem cell proliferation in the subgranular zone.

Possible epigenetic mechanisms underlying this ethanol-induced hippocampal neurogenesis in C57BL/6J mice have been explored in the present study. In particular, we investigated whether chronic ethanol consumption could have an impact on chromatin remodeling and lead to changes in transcriptional activity of genes implicated in neural development and plasticity. Post-translational modifications of histones, with specific focus on those controlling the expression of the various *Bdnf* exons, were also analyzed in the ethanol-exposed mice. Our data support the

¹Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Center of Psychiatry and Neurosciences, INSERM UMR 894—CPN, Site Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ²Université Paris Descartes, Paris, France; ³UPMC, Université Paris 6, UMR S894, Paris, France; ⁴Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada and ⁵Department of Psychiatry and Neuropsychology, European Graduate School for Neuroscience (EURON), Maastricht University, Maastricht, The Netherlands. Correspondence: Dr L. Lanfumey, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Center of Psychiatry and Neurosciences, INSERM UMR 894—CPN, Site Pitié-Salpêtrière, 91, Boulevard de l'Hôpital, Paris, Cedex 13 75634, France.

E-mail: laurence.lanfumey@upmc.fr

Received 30 August 2013; revised 12 February 2014; accepted 17 March 2014

idea that the ethanol-induced changes of these epigenetic processes enhance BDNF expression, which in turn stimulates hippocampal neurogenesis through TrkB receptor activation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male (8-week-old) C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) were housed under standard laboratory conditions (22 ± 2 °C, 60% relative humidity, 12–12-h light–dark cycle, food and water *ad libitum*) for at least 1 week before starting the free-choice ethanol paradigm^{23,24} described in Supplementary Materials and Methods. Separate groups of mice subjected to the free-choice ethanol paradigm were used for each series of determinations (except where indicated; see below). The number of mice used and the quantity of ethanol consumed for each set of experiments are indicated in Supplementary Table S1.

All experiments were performed in strict conformity with institutional guidelines in compliance with French (Service de Protection et Santé Animales, Préfecture de Police, Autorization nb B-75-977 to L.L.) and European Communities (86/609/EEC, 24 November 1986) Directives for use of animals in biomedical research.

TrkB antagonist treatment

Mice ($n=30$) of 'water' and 'ethanol' groups were randomly distributed to receive either the TrkB antagonist ANA-12²⁵ (Maybridge, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) or its vehicle (1% dimethylsulfoxide, 1% Tween 80, in 0.9% NaCl). The treatment consisted of repeated administration of ANA-12 (0.5 mg kg⁻¹, intraperitoneal (i.p.), once daily) or vehicle for the whole stabilization period of the free-choice ethanol paradigm (10% ethanol in drinking water). Volumes of ethanol and water intakes were measured every other day.

Reverse transcription (RT) and quantitative PCR

At the end of the free-choice ethanol or water exposure (day 21), animals were killed by cervical dislocation and their hippocampi were quickly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until real time RT-qPCR determinations as described in Supplementary Materials and Methods.

Immunohistochemistry

Immediately after cervical dislocation (on day 21 of the alcohol/water-free choice paradigm), brains were removed, frozen in isopentane at -35 °C and stored at -80 °C until use for immunolabeling as described in Supplementary Materials and Methods.

Immunoblotting

Mice were killed as above and their bilateral hippocampi were rapidly dissected out, and then stored at -80 °C until use. Total proteins were extracted using a lysis buffer (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 0.5% Triton X-100) containing freshly prepared protease and phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, 12505200, Roche, Meylan, France; sodium orthovanadate 2 mM and sodium fluoride 2 mM). Samples were sonicated and centrifuged at 14 000 × *g* for 30 min at 4 °C. Supernatants were removed and frozen at -20 °C until western blotting experiments. The protein content in supernatants was measured using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Proteins (40 µg) were electrophoresed in duplicate in a 4–12% Bis-Tris gel (Novex, Life Technologies, Saint Aubin, France), and then electrically transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Novex, Life Technologies) using the iBlot System (Novex, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Membranes were saturated 1 h at room temperature with 5% bovine serum albumin (w/v) in Tris-buffered Saline with 0.1% Tween-20 (TBST) then incubated overnight with one of the following primary antibodies: anti-H3Ac (06–599, Millipore, Molsheim, France), anti-H3K4me3 (04–745, Millipore), anti-H3K27me2 (ab24684, Abcam, Paris, France) or pan-histone H3 (04–928, Millipore) diluted in TBST with 5% bovine serum albumin. After extensive washing in TBST buffer, membranes were incubated with anti-rabbit IRdye 800CW-coupled IgG (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA). Fluorescence of the immunoblots was analysed at 800 nm using an Odyssey infrared imager (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). The relevant immunoreactive bands were

RESULTATS EXPERIMENTAUX

quantified using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and normalized with the total protein expression. Data normalized for each blot were expressed as percentage of 'water' mice.

BDNF ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) assay

ELISA assay to measure BDNF concentration was performed on the same pool of proteins obtained from hippocampal extraction for immunoblotting analysis. BDNF concentrations were determined at dilution of 1:20 with a commercial BDNF assay (Promega, Charbonnières, France), in 96-well plates (Nunc-Immuno plate, ThermoScientific, Villebon, France), according to the manufacturer's instructions.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis

Hippocampi of 'ethanol' and 'water' mice were quickly removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use for ChIP analysis. Details of ChIP procedure are presented in Supplementary Materials and Methods. Chromatin was immunoprecipitated with 2 µg of anti-H3Ac (06–599, Millipore) or anti-H3K4me3 (04–745, Millipore) antibodies.

DNA, immunoprecipitated with anti-histone antibodies, was analyzed using PCR with specific primers to amplify the different promoters of the *bdnf* gene. Primers used are listed in Supplementary Table S3. Amplification reactions were carried out as follows: 94 °C, 2 min; followed by 30 cycles of 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s and 72 °C, 1 min, and 72 °C, 3 min. PCR products were loaded on 2% agarose gels and blots were quantified using the ImageJ software and normalized with reference to 'INPUT' for each mouse.

Hippocampal cell survival, differentiation and cell death

To study cell survival and differentiation in the hippocampus during free-choice ethanol paradigm, mice were injected once daily with bromodeoxyuridine (BrdU, 75 mg kg⁻¹, i.p.; Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France), an analogue of thymidine incorporated into DNA during the S-phase of cell cycle, from day 8 to day 14 of the ethanol intake procedure, at the beginning of the 10% period (Supplementary Figure S1). This procedure allowed detecting cells that survived after proliferation.²⁶ In order to determine the differentiation of newborn cells, triple immunofluorescent labeling was performed using antibodies against BrdU, NeuN (neuron-specific nuclear protein) and GFAP (glial fibrillary acidic protein). Cell death was evaluated by cresyl-violet staining. Details of protocols can be found in Supplementary Materials and Methods.

Statistical analyses

All values in the text and figure legends are means ± s.e.m. Data from immunohistochemistry of post-translational modifications of histones and proliferating cells immunolabeled by Ki-67 antibody, as well as data on *Bdnf* mRNA expression after ANA-12 treatment were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test for multiple comparisons or a two-way (ethanol × structures) ANOVA, followed, where appropriate, by planned pairwise comparisons using the Dunn's *t*-test with the error variance term from the ANOVA.²⁷ Other results were analyzed using Student's *t*-test. The Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Ethanol intake

Mice were offered ethanol (at increasing concentration, from 3 to 10% v/v) versus water for 21 days. Daily ethanol quantity consumed reached a stable level of 10.76 ± 0.20 g kg⁻¹ per day ($n=36$) when free choice was given between water and 10% ethanol (Supplementary Figure S1 and Supplementary Table S1). Total fluid intake in the 'ethanol' group (140.60 ± 13.32 g kg⁻¹ per day, $n=36$) did not differ from that of the 'water' group (158.10 ± 15.02 g kg⁻¹ per day, $n=24$).

Effect of ethanol on the expression of genes implicated in chromatin remodeling

Hippocampal levels of mRNAs encoding HDACs, methyl CpG-binding protein 2, methyl-CpG-binding domain protein 1 and

nuclear receptor co-repressor (Ncor), which recruits HDAC to induce gene repression by chromatin compaction, were measured in 'ethanol' mice that had free access to ethanol in comparison with 'water' mice that had access to tap water only (Supplementary Table S5). One-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test showed that *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac5* and *Ncor* mRNAs' expression levels were significantly reduced by ethanol intake ($t_{17,110}=3.513$; $t_{17,110}=3.038$; $t_{17,110}=4.893$; $t_{17,110}=3.628$, $P<0.05$, respectively). In contrast, *Mecp2* mRNAs' levels were increased ($t_{17,110}=4.545$, $P<0.05$), whereas those of *Hdac3*, *Hdac4*, *Hdac9* and *Mbd1* were not modified ($t_{17,110}=1.418$; $t_{17,110}=2.759$; $t_{17,110}=0.4170$; $t_{17,110}=1.118$, $P>0.05$, respectively) in 'ethanol' compared with 'water' mice (Supplementary Table S5). The decreased expression of *Hdac2* was further validated by immunohistochemical labeling that showed a significant ethanol-induced decrease in HDAC2 immunostaining specifically in the DG ('water', 1.00 ± 0.04 , $n=6$; 'ethanol', 0.83 ± 0.04 , $n=8$; $P=0.016$, Student's *t*-test). HDAC2 immunolabeling in CA3 remained unchanged by ethanol consumption ('water', 1.00 ± 0.02 , $n=6$; 'ethanol', 1.01 ± 0.08 , $n=8$; $P=0.935$, Student's *t*-test).

Histone post-translational modifications in the hippocampus after chronic ethanol

The consequences of ethanol-induced modifications in *Hdacs* expression were analyzed at the histone level with both immunohistochemistry and immunoblotting. Using specific antibodies

against acetylated histone H3 (H3Ac), histone H3 with trimethylated lysine 4 (H3K4me3) and dimethylated lysine 27 (H3K27me2) or acetylated histone H4 (H4Ac), immunohistochemical analyses showed that these modified histones, which regulate gene transcription, were differentially affected by ethanol in hippocampus subfields (Figure 1a). A two-way ANOVA (with ethanol and the hippocampus subfields as main factors) revealed a significant effect of ethanol consumption on H3K4me3 ($F_{(1,22)}=13.33$; $P<0.01$), H3K27me2 ($F_{(1,25)}=5.52$; $P<0.05$) and H4Ac ($F_{(1,20)}=9.58$; $P<0.01$) but not H3Ac ($F_{(1,22)}=0.001$; $P>0.05$) and no significant interaction between ethanol intake and hippocampus subfields (H3Ac ($F_{(1,22)}=0.25$; $P>0.05$); H3K4me3 ($F_{(1,22)}=0.07$; $P>0.05$); H3K27me2 ($F_{(1,25)}=3.75$; $P>0.05$); H4Ac ($F_{(1,20)}=0.66$; $P>0.05$)). Dunn's *t* post test showed that H3Ac immunostaining intensity was modified neither in the DG ($t_{3,22}=0.33$, $P>0.05$) nor in the CA3 field ($t_{3,22}=0.38$, $P>0.05$) of the Ammon's horn in 'ethanol' compared with 'water' mice. In contrast, immunolabelings of both H3K4me3 and H4Ac, which underlie active transcription, were significantly different within the DG (H3K4me3, $t_{3,22}=2.701$, $P<0.05$; H4Ac, $t_{3,20}=2.77$, $P<0.05$, Dunn's *t*-test) in 'ethanol' versus 'water' mice. Significant ethanol-induced changes were also noted in the immunolabeling of H3K4me3 ($t_{3,22}=2.457$, $P<0.05$, Dunn's *t*-test) but not H4Ac (H4Ac, $t_{3,20}=1.613$, $P>0.05$, Dunn's *t*-test) in CA3 (Figure 1b). Interestingly, the immunostaining of H3K27me2, which is mainly associated with repressed transcription, was also significantly different in the DG ($t_{3,25}=2.993$, $P<0.05$, Dunn's *t*-test) but not

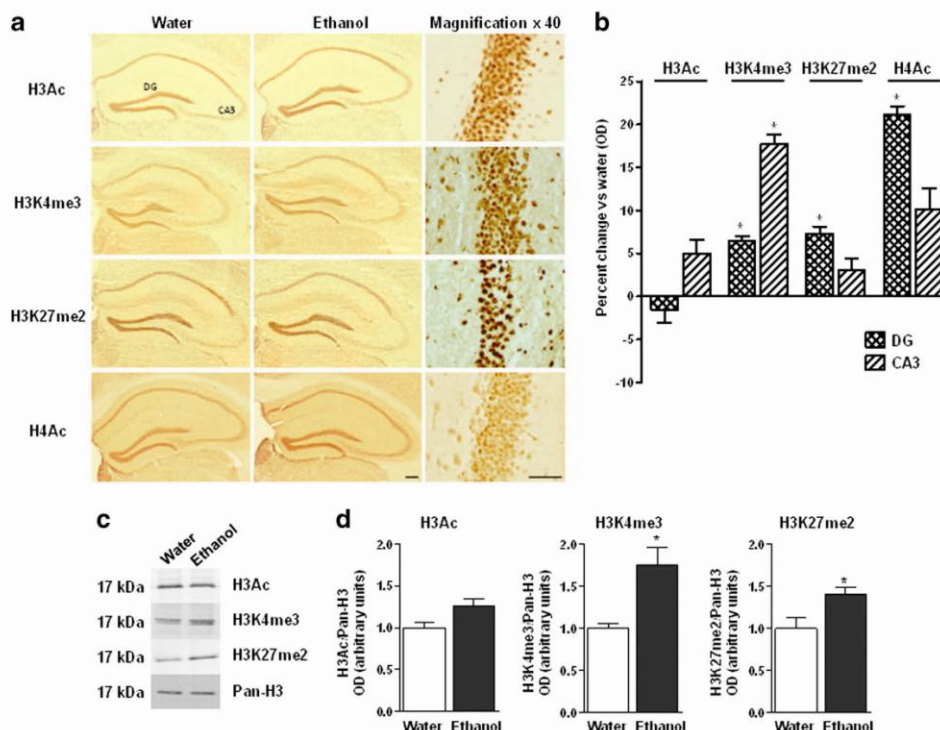


Figure 1. Chronic and voluntary ethanol consumption induces changes in histone post-translational modifications in the hippocampus. (a) Photomicrographs showing the distribution of H3Ac (acetylated histone H3), H3K4me3 (trimethylated histone H3 on lysine 4), H3K27me2 (dimethylated histone H3 on lysine 27) and H4Ac (acetylated histone H4) immunolabeling in the hippocampus (DG: dentate gyrus; CA3: CA3 subfield of Ammon's horn) of a 'water' and an 'ethanol' mouse; scale bar: 200 μm. Photomicrographs in the right-hand column are magnifications (x40) showing immunolabeled cells in the granular cell layer of the DG (in a 'water' mouse); scale bar: 50 μm. (b) Quantification (OD) of histone immunolabeling in the DG and CA3 subfield expressed as percent change in 'ethanol' versus 'water' mice. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=5$ ('water') and $n=8$ ('ethanol') mice; * $P<0.05$, planned pairwise comparisons, Dunn's *t*-test. (c) Western blots of post translationally modified histone H3 and Pan-histone H3 ratio in 'water' and 'ethanol' mice. No difference was noted for H3Ac while H3K4me3 and H3K27me2 labelings were significantly increased after ethanol consumption. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=6$ ('water') and $n=8$ ('ethanol') mice; * $P<0.05$, Student's *t*-test.

Table 1. Effects of chronic ethanol intake on hippocampal levels of mRNAs encoding trophic factors

Gene	Water	Ethanol	Percent over water	P-value
<i>Bdnf</i>	1.004 ± 0.047 (5)	1.372 ± 0.088 (7)	+36.65	^a
<i>Trkb</i>	0.999 ± 0.024 (5)	0.904 ± 0.029 (8)	−9.51	ns
<i>Bcl-2</i>	1.015 ± 0.085 (5)	1.370 ± 0.093 (7)	+34.98	^a
<i>Fgf-1</i>	1.004 ± 0.046 (5)	1.265 ± 0.050 (7)	+26.00	ns
<i>Fgf-2</i>	1.006 ± 0.055 (5)	1.193 ± 0.042 (7)	+18.59	ns
<i>Gdnf</i>	1.076 ± 0.207 (5)	1.229 ± 0.110 (7)	+14.22	ns

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; ns, not significant; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. mRNA levels were measured using real-time RT-qPCR in the hippocampus of 'water' and 'ethanol' mice. Results (mean ± s.e.m. of (n) mice) are expressed as arbitrary units after normalization to the endogenous reference genes encoding *Gapdh* or *Hprt* and β -actin. ^a $P < 0.05$, 'ethanol' versus 'water' mice; one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

CA3 ($t_{3,25} = 0.296$, $P > 0.05$, Dunn's t -test) between 'ethanol' and 'water' mice (Figure 1b). These data were further confirmed with immunoblotting experiments. As shown in Figures 1c and d, although the level of total acetylated histone H3 was not affected by ethanol consumption ($P = 0.83$, ns, Student's t -test), both H3K4me3 and H3K27me2 levels were significantly higher in the hippocampus of 'ethanol' compared with 'water' mice ($P = 0.015$ and $P = 0.018$, Student's t -test, respectively).

Effects of ethanol on the hippocampal expression of genes implicated in trophic factor signaling

As shown in Table 1, RT-qPCR analysis evidenced that ethanol consumption led to enhanced *Bdnf* (exon IX) and *Bcl2* mRNAs' expression ($t_{11,59} = 3.139$; $t_{11,59} = 3.026$, $P < 0.05$, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test, respectively). Similarly, *Fgf1*, *Fgf2* and glial cell-derived neurotrophic factor (*Gdnf*) mRNAs' expression tended to increase after ethanol consumption, whereas, in contrast, *Trkb* mRNA levels were slightly decreased in the 'ethanol' group. However, the latter differences between 'ethanol' and 'water' mice did not reach statistical significance (*Fgf1* ($t_{11,59} = 2.232$, $P > 0.05$), *Fgf2* ($t_{11,59} = 1.545$, $P > 0.05$), *GDNF* ($t_{11,59} = 1.824$, $P > 0.05$), *Trkb* ($t_{11,59} = 0.832$, $P > 0.05$), one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test).

In addition, ethanol consumption significantly enhanced the expression of mRNAs encoding the bHLH neural activator *NeuroG2* ($t_{11,66} = 3.397$, $P < 0.01$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test) while significantly reducing the hippocampal levels of transcript encoding the bHLH inhibitor *ID3* ($t_{11,66} = 2.765$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test; Supplementary Table S6). On the other hand, hippocampal levels of *NeuroD1* and *NeuroG1* mRNAs remained unaffected by ethanol consumption ($t_{11,66} = 1.570$; $t_{11,66} = 2.275$, $P > 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, respectively).

Hippocampal BDNF expression after chronic ethanol intake

Differential expression of *Bdnf* exons. As BDNF has a key role in brain plasticity, we studied the effect of ethanol on the expression of the different *Bdnf* exons. In addition to hippocampal levels of mRNA transcribed from *Bdnf* exon IX, which contains the sequence encoding BDNF (see Table 1), those from *Bdnf* exons II, III and VI were also significantly increased in 'ethanol' versus 'water' mice ($t_{11,62} = 3.083$; $t_{11,62} = 4.615$; $t_{11,62} = 2.803$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, respectively, Figure 2a). In contrast, those from exon VIII were significantly decreased ($t_{11,62} = 2.801$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, Figure 2a), whereas no changes in transcripts

from exons I ($t_{11,62} = 0.078$, $P > 0.05$) and IV ($t_{11,62} = 0.010$, $P > 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test) were noted after ethanol consumption. On the other hand, mRNAs corresponding to exons V and VII were detected neither in 'water' nor in 'ethanol' mouse hippocampus (data not shown).

Chromatin remodeling at *Bdnf* promoters. In order to further investigate the effects of ethanol on *Bdnf* gene expression, ChIP analyses of histone modifications were performed at *Bdnf* promoters (P) whose exon expression was modified by ethanol intake. Ethanol strongly stimulated H3K4me3 enrichment at PII and PIII ($t_{9,55} = 3.773$; $t_{9,55} = 2.841$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, respectively, Figures 2d and e). Moreover, ChIP analyses of H3Ac bound to these promoters showed no modification at PII ($t_{9,55} = 1.005$, $P > 0.05$) and a reduction at PIII ($t_{9,55} = 2.736$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, Figures 2b and c). The increase in exon VI mRNA expression (Figure 2a) was associated with an enrichment in H3Ac ($t_{9,55} = 2.686$, $P < 0.05$, Figure 2b) without any modification of H3K4me3 ($t_{9,55} = 0.656$, $P > 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, Figure 2e) at PVI. Significant reductions in H3Ac and H3K4me3 were observed at PVIII ($t_{9,55} = 2.862$; $t_{9,55} = 3.529$, $P < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison test, respectively, Figures 2b–e), in accordance with the lower expression of exon VIII (Figure 2a).

Hippocampal BDNF expression. In order to validate the data on *Bdnf* mRNA expression (Table 1), both quantitative ELISA determination of BDNF concentration and immunostaining of BDNF were performed within the hippocampus of 'ethanol' and 'water' mice. ELISA assay evidenced a significantly higher BDNF concentration ($P = 0.0263$, Student's t -test) in the hippocampus of 'ethanol' compared with 'water' mice (Figure 2f). BDNF immunostaining was only detected in the hilus of the DG and the CA3 area (Figure 2g). Immunostaining quantification confirmed higher BDNF protein expression in the hilus ($P = 0.0331$, Student's t -test) and CA3 ($P = 0.0391$, Student's t -test) subfields of the hippocampus in 'ethanol' compared with 'water' mice (Figure 2h).

Hippocampal cell survival and neural differentiation after chronic ethanol intake

BrdU staining was performed in both 'ethanol' and 'water' mice in order to assess cell survival in the hippocampus after voluntary, moderate and chronic ethanol intake. A two-way ANOVA showed no interaction between ethanol and cell survival ($F_{(1,21)} = 1.474$; $P > 0.05$) but a significant effect of ethanol consumption on the number of BrdU-positive cells in the subgranular zone of the DG ($F_{(1,21)} = 10.79$; $P = 0.0035$) (Figures 3a and b). Moreover, cresyl-violet staining performed to measure cell apoptosis did not reveal any significant difference in the number of pyknotic nuclei between 'water' and 'ethanol' groups (Supplementary Figure S2). On the other hand, BrdU⁺/NeuN⁺ and BrdU⁺/GFAP⁺ labeled cell (illustrated in Figure 3c) ratios were also equivalent in 'ethanol' and 'water' mice (Figure 3d) 4 weeks after BrdU injections. Indeed, in both groups, ~60% of BrdU-labeled cells expressed the neuronal marker NeuN, and the remaining ~40% expressed the astrocyte marker GFAP (Figure 3d).

Effect of the TrkB antagonist ANA-12 on ethanol-induced hippocampal neurogenesis and *Bdnf* expression

In order to determine whether BDNF-TrkB signaling was involved in ethanol-induced neurogenesis in C57BL/6J mice, the selective TrkB receptor antagonist ANA-12²⁵ was administered daily at the dose of 0.5 mg kg^{−1} i.p. for the whole stabilization period (10% ethanol, from day 8 to day 21) of the free-choice paradigm. ANA-12 treatment affected neither water consumption in both 'water' and 'ethanol' groups ($F_{(1,26)} = 0.040$; $P = 0.8425$, two-way

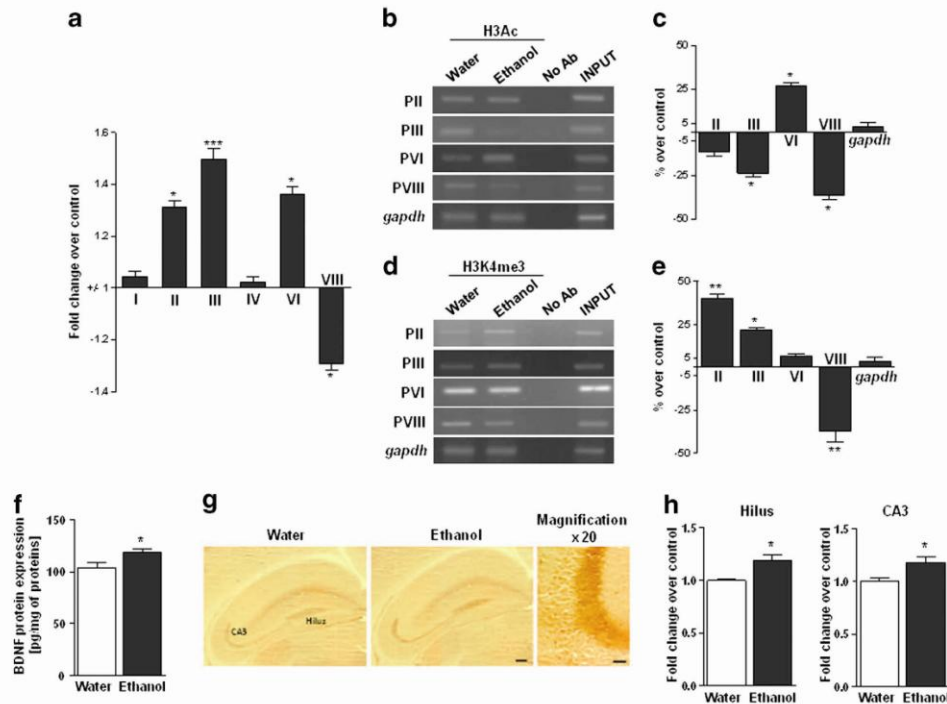


Figure 2. Ethanol intake induces differential *Bdnf* exon expression, chromatin remodeling at the *Bdnf* promoter and increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in the hippocampus. **(a)** mRNAs transcribed from *Bdnf* promoters were quantified by real-time RT-qPCR and normalized to the housekeeping genes *Hprt* and β -actin. Data are expressed as fold-change in 'ethanol' versus 'water' mice ($+/-1$). In 'ethanol' mice, expression of exons II, III and VI was significantly increased, whereas that of exon VIII was significantly decreased. Transcripts from exons V and VII were not detected. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=5$ ('water') and $n=9$ ('ethanol') mice; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test. **(b and d)** Representative chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis of H3Ac and H3K4me3 bound to *Bdnf* promoters II (PII), III (PIII), VI (PVI) and VIII (PVIII), and control promoter *Gapdh* in 'water' and 'ethanol' mice. **(c and e)** Quantification of ChIP analyses shows that the levels of H3Ac **(c)** were significantly decreased in 'ethanol' versus 'water' mice at PIII and PVIII, increased at PVI and not modified at PII. Those of H3K4me3 **(e)** were significantly increased at PII and PIII, decreased at PVIII and not modified at PVI. Quantification after PCR amplification of immunoprecipitated DNA is expressed as percent change in 'ethanol' versus 'water' (control) mice. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=5$ ('water') and $n=9$ ('ethanol') mice; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test. **(f)** Hippocampal BDNF protein expression (measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) was increased after ethanol intake compared to 'water' group. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=5$ ('water') and $n=9$ ('ethanol') mice; * $P < 0.05$, Student's *t* test. **(g)** Representative photomicrographs showing that BDNF immunolabeling is located mainly in the hilus of the dentate gyrus (DG) and in the CA3 layer of Ammon's horn in both a 'water' and an 'ethanol' mouse; scale bar: 200 μ m. Magnification ($\times 20$) of BDNF immunolabeling in the CA3 layer of a 'water' mouse; scale bar: 50 μ m. **(h)** Quantification (OD) of BDNF immunostaining in the hilus and CA3 subfield, expressed as fold change in 'ethanol' versus 'water' mice. BDNF immunostaining in both hilus and CA3 was significantly increased in 'ethanol' compared with 'water' mice. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=5$ ('water') and $n=9$ ('ethanol') mice; * $P < 0.05$, Student's *t*-test.

ANOVA, Figure 4a) nor ethanol intake in the 'ethanol' group ($P=0.4032$, Student's *t*-test, Figure 4b).

Cell proliferation in the DG after 10% ethanol or water intake and ANA-12 treatment was quantified using Ki-67 immunolabeling. A two-way ANOVA showed an interaction between ethanol intake and ANA-12 ($F_{(1,26)}=4.55$; $P < 0.05$). Bonferroni *post hoc* indicated a significant increase in the number of Ki-67 immunoreactive cells in 'ethanol' mice compared with 'water' mice after daily treatment with the vehicle ($P < 0.05$, Figure 4c), corroborating BrdU data (Figure 3b). As illustrated in Figure 4c, chronic treatment with ANA-12 completely suppressed the stimulatory effect of ethanol intake on hippocampal cell proliferation ($P > 0.05$). Indeed, the number of Ki-67 immunoreactive cells in ANA-12-treated 'ethanol' mice was similar to those in 'water' mice of the vehicle- and the ANA-12-treated subgroups. On the other hand, cresyl-violet staining to determine the number of pyknotic nuclei showed that neither ANA-12 nor ethanol influenced apoptosis ($F_{(1,24)}=0.586$, $P > 0.05$; $F_{(1,24)}=0.216$, $P > 0.05$, two-way ANOVA, respectively) (Figure 4d). Similarly, the stimulatory effect of ethanol intake on *Bdnf* expression was not modified by ANA-12

treatment (Figure 4e). A two-way ANOVA revealed a significant main effect of ethanol intake ($F_{(1,24)}=18.93$, $P < 0.001$) but no effect of ANA-12 treatment ($F_{(1,24)}=0.01$, $P > 0.05$) and no interaction ($F_{(1,24)}=1.06$, $P > 0.05$). Accordingly, the specific blockade by ANA-12 of ethanol-induced increase in hippocampal cell proliferation strongly supported the idea that TrkB activation had a key role in this neuroplastic change in 'ethanol' mice.

DISCUSSION

Our studies showed that a moderate and chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induced important changes in the epigenetic landscape in the hippocampus, therefore supporting and extending data already reported after acute and forced chronic ethanol ingestion in rats.^{16,17} In particular, we provided evidence that ethanol-induced epigenetic modifications at the *Bdnf* gene enhanced BDNF expression which, in turn, stimulated neurogenesis in the subgranular zone of the DG through TrkB receptor activation.

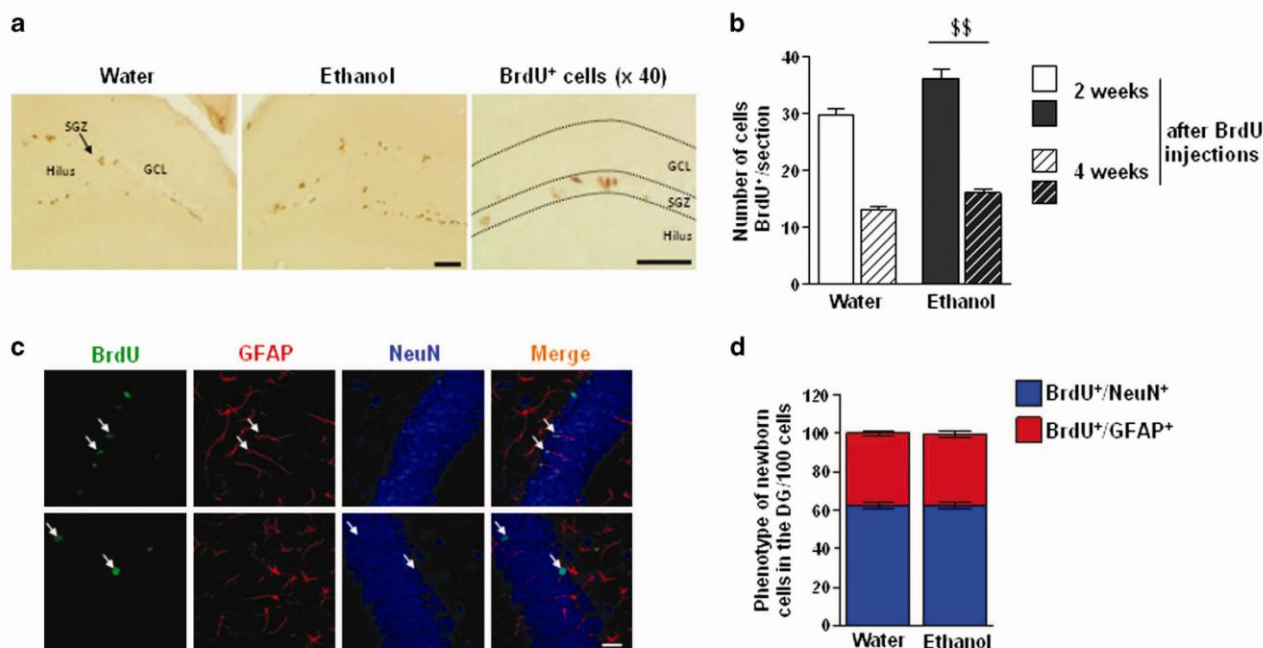


Figure 3. Hippocampal cell survival and differentiation are increased in ethanol-drinking mice. (a) Photomicrographs showing the distribution of bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus in a 'water' and an 'ethanol' mouse 2 weeks after BrdU injections. Immunolabeled cells are located in the subgranular zone (SGZ) at the border between the hilus and the granular cell layer (GCL). Scale bars: 50 μ m. (b) The number of BrdU-labeled cells in the DG was significantly higher in 'ethanol' than in 'water' mice 2 and 4 weeks after BrdU injections. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=4$ ('water') and $n=8$ ('ethanol') mice; $^{ss}P < 0.01$, 'ethanol' versus 'water' mice at both 2 and 4 weeks after BrdU injections, effect of ethanol, two-way ANOVA. (c) Confocal microscopy photomicrographs of BrdU⁺ (green), neuron-specific nuclear protein⁺ (NeuN⁺; blue) and glial fibrillary acidic protein⁺ (GFAP⁺; red) labeled cells in the GCL 4 weeks after BrdU injections. Arrows indicate cells double-labeled for BrdU and GFAP (top) or BrdU and NeuN (bottom). Scale bar: 20 μ m. (d) Phenotype distribution of newborn cells in the GCL 4 weeks after BrdU injections. Ratios of BrdU⁺/NeuN⁺ and BrdU⁺/GFAP⁺ double-labeled cells were not different between 'ethanol' and 'water' mice. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=4$ ('water') and $n=8$ ('ethanol') mice.

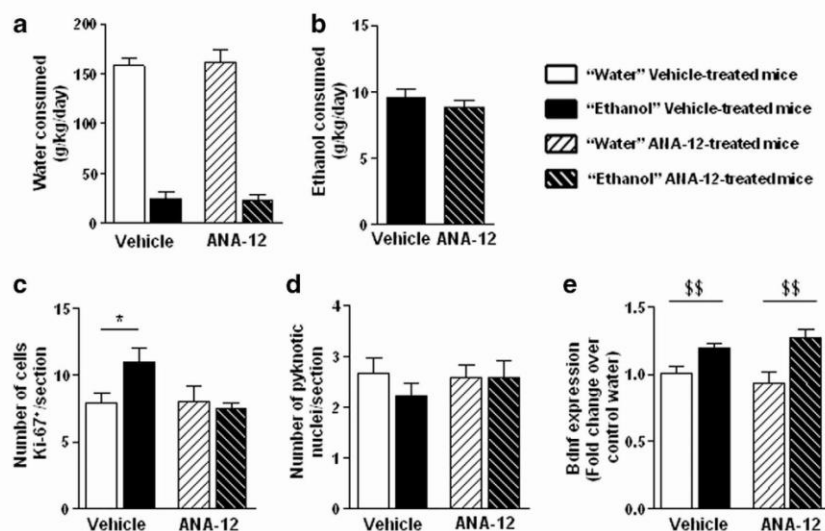


Figure 4. ANA-12 treatment affects neither ethanol consumption nor ethanol-induced *Bdnf* expression but suppresses ethanol-induced cell proliferation in the hippocampus. (a and b) Neither water (a) nor ethanol (b) intake during the 10% stabilization period of the free-choice ethanol protocol was modified by chronic administration of ANA-12 (0.5 mg kg⁻¹ i.p., once a day) in 'water' and 'ethanol' mice. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=6$ (vehicle- and ANA-12-treated 'water' mice) or $n=9$ (vehicle- and ANA-12-treated 'ethanol' mice). (c) The number of proliferative Ki-67-immunoreactive cells per section in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) was significantly increased in vehicle-treated 'ethanol' mice compared with vehicle-treated 'water' mice but did not differ in ANA-12-treated groups. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=6$ (vehicle- and ANA-12-treated 'water' mice) or $n=9$ (vehicle- and ANA-12-treated 'ethanol' mice); $^{*}P < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni *post hoc*. (d) The number of pyknotic nuclei did not differ between 'water' and 'ethanol' mice in both vehicle- and ANA-12-treated groups. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=6$ (vehicle- and ANA-12-treated 'water' mice) or $n=9$ (vehicle- and ANA-12-treated 'ethanol' mice). (e) mRNAs transcribed from *Bdnf* exon IX were quantified using real-time RT-qPCR and normalized to the housekeeping genes *Hprt* and β -actin. A significant increase in *Bdnf* expression was observed in 'ethanol' mice of both vehicle- and ANA-12-treated subgroups. Each bar is the mean $\pm$ s.e.m. of $n=6$ (vehicle- and ANA-12-treated 'water' mice) or $n=9$ (vehicle- and ANA-12-treated 'ethanol' mice); $^{ss}P < 0.01$, effect of ethanol, two-way ANOVA.

Ethanol has been shown to influence gene expression by modulating the synthesis and/or activity of enzymes that modify chromatin structure such as HDACs and HATs,^{16,28} which exert repressive/permmissive effects, respectively, on gene transcription by removing/adding acetyl groups at histone tails.²⁹ In particular, inhibition of HDAC activity by valproate has been reported to increase neurogenesis through a stimulatory influence on the expression of genes belonging to the bHLH transcription factor family, especially the *Neurod* gene, in primary culture of rat neural progenitors.³⁰ On the other hand, treatment with sodium butyrate to reduce HDAC activity also induced cell proliferation, migration and differentiation underlain by BDNF-TrkB signaling in ischemic brains.³¹ Finally, HDAC inhibition by trichostatin A was found to prevent, through BDNF-dependent mechanisms, the decline in hippocampal neuroplasticity associated with aging in rats.³² In our mouse model, ethanol consumption downregulated the expression of *Hdac 1, 2 and 5*, suggesting a global downregulation of the HDAC machinery.

Whether or not the modifications of hippocampal *Hdacs* expression after ethanol intake resulted in downstream modifications of histone acetylation was analyzed with immunohistochemistry and western blot. Indeed, the decrease in *Hdacs* expression was found to be associated with an increase in H4Ac in the DG, in agreement with data reported in *Hdac2*-deficient mice by Guan *et al.*³³ Interestingly, in both DG and CA3, ethanol intake also enhanced the immunolabeling of H3K4me3, a methylated histone associated with pro-neural gene expression during differentiation.^{34,35} Therefore, in addition to those affecting *Hdacs* expression and histone acetylation, ethanol-induced modifications of histone methylation might also underlie neuroplastic changes at the hippocampal level in ethanol-exposed mice.

In the hippocampus of C57BL/6J mice that had freely consumed ethanol, we found that BDNF expression was significantly upregulated at both mRNA and protein levels. Similarly, an increase in hippocampal BDNF expression was reported in rats after 6 and 12 weeks (but not after 18 and 24 weeks) of repeated episodic ethanol consumption.³⁶ These data are in sharp contrast with previous studies that showed either no change in hippocampal BDNF expression when ethanol was given as the sole fluid source for a long (19–28 weeks) period,^{37,38} or a decreased expression of this neurotrophic factor 48 h after a 28-week period of forced ethanol consumption³⁹ or just at the end of a 10-day episodic exposure to ethanol vapor.⁴⁰ Such discrepancies regarding the effects of ethanol on BDNF expression are probably explained by differences in the duration as well as the mode of ethanol consumption from one paradigm to another. It is worthwhile to note that under our conditions (unlimited and free access to alcohol), chronic ethanol intake leads to a maximum blood ethanol concentration of 50–70 mg per 100 ml during the drinking period (dark phase of the 24-h nycthemeral cycle) (ES, unpublished observations^{41,42}), a value far below that measured in human alcoholics (which can reach 300–600 mg per 100 ml). In rodents, unlike humans, self-administration only rarely ends with intoxication, ethanol intake stopping once blood concentration has reached ~50–70 mg per 100 ml, levels at which ethanol catabolism and elimination proceed at maximal rates in rodents.⁴¹

Under the free-choice conditions used in our studies, ethanol intake in C57BL/6J mice stimulated the expression of both trophic factors and pro-neurogenic factors, especially BDNF that promotes hippocampal neurogenesis through TrkB activation.^{4,20} Interestingly, and as expected of a TrkB-mediated effect, ethanol-induced neurogenesis upregulation was completely abolished under TrkB receptor blockade by ANA-12, a selective TrkB receptor antagonist.²⁵ Indeed, neither ethanol intake nor *Bdnf* expression levels were affected by ANA-12 treatment, indicating that the suppression of ethanol-induced neurogenesis by this drug was really because of TrkB blockade and not because of some upstream unspecific events that might have occurred during

treatment. In contrast to ethanol-induced neurogenesis, basal neurogenesis observed in the 'water' group was not affected by TrkB inhibition by ANA-12, thereby suggesting that distinct mechanisms are involved in the regulation of hippocampal neurogenesis under ethanol-stimulated versus basal conditions.

Upregulation of BDNF expression was very probably related to ethanol-induced changes in *Bdnf* gene transcription because an upregulation of mRNAs transcribed from *Bdnf* exons II, III and VI was found in mice that had consumed ethanol. The concomitant reduction in *Bdnf* exon VIII expression, whose role is not yet fully understood,³² was probably because of chromatin compaction after demethylation (on lysine 4) and deacetylation of histone H3, as suggested by the reduction of both H3Ac and H3K4me3 enrichment at the PVIII of the *Bdnf* gene.

Interestingly, we also found an increased expression of the anti-apoptotic and survival protein *Bcl2*,⁴³ in parallel with increased H3K4me3 levels in the hippocampus of mice that had drunk ethanol under free-choice conditions. Similarly, in post-mortem brains of alcoholic patients, Ponomarev *et al.*⁴⁴ showed that upregulation of GC-rich genes was associated with the H3K4me3 epigenetic mark at the *Bcl2l1* gene. As the *Bdnf* gene also contains several CpG islands and its transcription depends, in part, on both the methylation of CG dinucleotides and the binding of methyl-binding proteins,⁴⁵ it can be inferred that, under our conditions of ethanol consumption, the increase in *Bdnf* gene transcription might have resulted from H3K4me3 enrichment at its promoters II and III. However, further studies are needed to directly investigate chromatin remodeling at the *Bcl2* gene and to determine the methylation profile of the *Bdnf* gene in C57BL/6J mice after ethanol consumption.

Under forced intake protocols in rodent models, both anxiolytic (under acute ethanol intake) and anxiogenic (under withdrawal after a 2-week-ethanol intake) effects of ethanol have been described in association with both chromatin remodeling in the amygdaloid brain region¹⁶ and deficits in hippocampal cell proliferation and survival.¹ In contrast, in ethanol-preferring C57BL/6J mice, chronic voluntary ethanol intake stimulates hippocampal cell proliferation²² and prevents, at least partially, the parallel decline in hippocampal neurogranin and cognitive abilities normally associated with aging.^{46,47} Whether ethanol-induced neurogenesis could impact anxiety-related behavior and cognitive performances under the free choice paradigm used in our studies will be the matter of further investigations.

Altogether, our results show that, in C57BL/6J mice, chronic and voluntary ethanol intake led to alterations in *Hdacs* expression, modifications of epigenetic landscape, *Bdnf* chromatin remodeling and neuroplasticity-related changes at the hippocampal level. In particular, we demonstrated that ethanol-induced neurogenesis is mediated by TrkB activation. Whether these effects are related to intracellular transduction systems directly affected by ethanol or involve the activation of receptors influenced by ethanol (such as those of the GABAergic system) is a question to be addressed in future studies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Jean-François Bernard and Anne Gautier for their expert help in image acquisition. This research was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), MILDT (APE07005DSA), IREB (2010/10 and 2011/15) and ANR (2011-BSV-017-01). E Stragier was recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) during performance of this work.

REFERENCES

- 1 Nixon K, Morris SA, Liput DJ, Kelso ML. Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol* 2010; **44**: 39–56.
- 2 Brailowsky S, García O. Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch Med Res* 1999; **30**: 3–9.
- 3 Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* 2009; **44**: 115–127.
- 4 Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 2009; **42**: 239–244.
- 5 Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 2002; **82**: 1367–1375.
- 6 Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Gotz M, Canossa M. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 15570–15575.
- 7 Sairanen M, Lucas G, Emfors P, Castren M, Castren E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2005; **25**: 1089–1094.
- 8 Covic M, Karaca E, Lie DC. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Heredity* 2010; **105**: 122–134.
- 9 Bonaguidi MA, Song J, Ming GL, Song H. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 2012; **22**: 754–761.
- 10 Juliandi B, Abernatsu M, Nakashima K. Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ* 2010; **52**: 493–504.
- 11 Juliandi B, Abernatsu M, Nakashima K. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 2010; **20**: 408–415.
- 12 Gonzales ML, LaSalle JM. The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders. *Curr Psychiatry Rep* 2010; **12**: 127–134.
- 13 Akbarian S, Chen RZ, Gribnau J, Rasmussen TP, Fong H, Jaenisch R *et al*. Expression pattern of the Rett syndrome gene MeCP2 in primate prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 784–791.
- 14 Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 115–124.
- 15 Na ES, Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM. The impact of MeCP2 loss- or gain-of-function on synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology* 2013; **38**: 212–219.
- 16 Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 2008; **28**: 3729–3737.
- 17 Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC. Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 73–88.
- 18 Crews FT, Nixon K. Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Res Health* 2003; **27**: 197–204.
- 19 Hansson AC, Nixon K, Rimondini R, Damadzic R, Sommer WH, Eskay R *et al*. Long-term suppression of forebrain neurogenesis and loss of neuronal progenitor cells following prolonged alcohol dependence in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; **13**: 583–593.
- 20 Paizanis E, Kelai S, Renoir T, Hamon M, Lanfumey L. Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations. *Neurochem Res* 2007; **32**: 1762–1771.
- 21 Stevenson JR, Schroeder JP, Nixon K, Besheer J, Crews FT, Hodge CW. Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; **34**: 1209–1222.
- 22 Aberg E, Hofstetter CP, Olson L, Brene S. Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005; **8**: 557–567.
- 23 Kelai S, Renoir T, Chouchana L, Saurini F, Hanoun N, Hamon M *et al*. Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 2008; **107**: 1660–1670.
- 24 Molet J, Bouaziz E, Hamon M, Lanfumey L. Early exposure to ethanol differentially affects ethanol preference at adult age in two inbred mouse strains. *Neuropharmacology* 2012; **63**: 338–348.
- 25 Cazorla M, Premont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 1846–1857.
- 26 Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, Melfort M, Gabriel C *et al*. Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; **13**: 759–774.
- 27 Kirk, RE. *Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences*. 2nd edn, Brooks/Cole Publishing Company: Pacific Groove, USA, 1982.
- 28 Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Shi G, Pandey SC. Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2012; **36**: 61–71.
- 29 Lee S, Lee SK. Crucial roles of histone-modifying enzymes in mediating neural cell-type specification. *Curr Opin Neurobiol* 2010; **20**: 29–36.
- 30 Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 16659–16664.
- 31 Kim HJ, Leeds P, Chuang DM. The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem* 2009; **110**: 1226–1240.
- 32 Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE *et al*. Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* 2011; **31**: 17800–17810.
- 33 Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J *et al*. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 2009; **459**: 55–60.
- 34 Lim DA, Huang YC, Swigut T, Mirick AL, Garcia-Verdugo JM, Wysocka J *et al*. Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* 2009; **458**: 529–533.
- 35 Wu M, Zhang Y, Wu NH, Shen YF. Histone marks and chromatin remodelers on the regulation of neurogenin1 gene in RA induced neuronal differentiation of P19 cells. *J Cell Biochem* 2009; **107**: 264–271.
- 36 Miller MW. Repeated episodic exposure to ethanol affects neurotrophin content in the forebrain of the mature rat. *Exp Neurol* 2004; **189**: 173–181.
- 37 Okamoto H, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kuma H, Gu H *et al*. Effects of chronic ethanol administration on the expression levels of neurotrophic factors in the rat hippocampus. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2006; **83**: 1–6.
- 38 Miller R, King MA, Heaton MB, Walker DW. The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain. *Brain Res* 2002; **950**: 137–147.
- 39 MacLennan AJ, Lee N, Walker DW. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1995; **197**: 105–108.
- 40 Hauser SR, Getachew B, Taylor RE, Tizabi Y. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; **100**: 253–258.
- 41 Murphy JM, Gatto GJ, Waller MB, McBride WJ, Lumeng L, Li TK. Effects of scheduled access on ethanol intake by the alcohol-preferring (P) line of rats. *Alcohol* 1986; **3**: 331–336.
- 42 Crabbe JC, Metten P, Rhodes JS, Yu CH, Brown LL, Phillips TJ *et al*. A line of mice selected for high blood ethanol concentrations shows drinking in the dark to intoxication. *Biol Psychiatry* 2009; **65**: 662–670.
- 43 Sasaki T, Kitagawa K, Yagita Y, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S *et al*. Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *J Neurosci Res* 2006; **84**: 1187–1196.
- 44 Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 2012; **32**: 1884–1897.
- 45 Boule F, van den Hove DL, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J *et al*. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 584–596.
- 46 Krazem A, Marighetto A, Higuieret P, Jaffard R. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav Brain Res* 2003; **147**: 17–29.
- 47 Krazem A, Mons N, Higuieret P, Jaffard R. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neurosci Lett* 2003; **338**: 62–66.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

Supplementary information

Supplementary Materials and Methods

Free-choice ethanol paradigm

Mice were housed singly in standard laboratory cages (Macrolon type 2, 22 x16 x14 cm) equipped with four tubes (20 mL), one containing tap water and the other three filled with ethanol dilutions in water for “ethanol” mice, while all tubes were filled with tap water for “water” mice. Previous data^{1,2} indicated that, in these conditions, the amount of ethanol ingested daily was slightly but regularly larger than the amount ingested when only one bottle of ethanol was offered versus one bottle of tap water. Animals had continuous free access to the drinking tips of tubes. “Ethanol” mice were exposed progressively to increasing concentrations of ethanol (0–10% ethanol in water within 21 days) under the free-choice procedure described by Kelaï *et al.*² (Figure S1). Briefly, mice were offered 3% ethanol (v/v) versus water for 4 days, then 6% ethanol versus water for the next 4 days, and finally animals had access to 10% ethanol versus water for the subsequent 12 days (stabilization period). Food (standard mouse pellets A03; UAR, Strasbourg, France) was given ad libitum. Absolute amounts of ethanol (as grams) consumed and total fluid (grams of ethanol solution plus tap water) intake/kg body weight/24 h were determined for each mouse. When offered a 10% ethanol solution, mice ingested on average 9-10 g/kg of pure ethanol per day. This amount, in the same range as those reported in previous studies in single housed C57BL/6J mice having free access to ethanol under the very same conditions as those used in our own study (see^{3,4}), is sufficient to yield blood ethanol levels near 50-70 mg/100 mL during the active drinking phase, i.e. the dark phase of the circadian cycle (see²). Mice were sacrificed between 10:00 and 12:00 am on day 21 or day 36 for the neurogenesis experiment, trunk blood samples were taken and blood ethanol concentrations were determined using a chemical analyser (Dimension® Xpand® Plus, Dade Behring, Paris, France) in order to verify that ethanol was fully metabolized and was not anymore detectable in blood.

Hippocampal cell survival, differentiation and death

Mice were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) at the end of the 21 or 36 day ethanol intake procedure, and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (sodium phosphate buffer 50 mM, NaCl 0.9%, pH 7.4). Brains were removed and postfixed overnight in 4% PFA at 4°C. The next day, serial sections (40 µm thick) were cut through the entire hippocampus using a vibratome, and sections were stored overnight in PBS at 4°C. Immunohistochemistry was performed following a procedure

adapted from Païzanis et al.⁵ Briefly, free-floating sections were permeabilized with 3 N HCl and then blocked with PBS containing 5% normal rabbit serum. Sections were incubated overnight with the primary anti-BrdU antibody (monoclonal-rat IgG, AbCys, Les Ulis, France) at 4°C. Then, they were incubated with the secondary antibody (biotinylated rabbit anti-rat IgG, Vector Laboratories, France), and stained using ABC staining system (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Paris, France). All BrdU-labeled cells in the dentate gyrus were counted using a computer image analysis system (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). Results are presented as the total number of BrdU-immunopositive cells per section.

In order to determine the differentiation of newborn cells, triple immunofluorescent labeling was performed using antibodies against BrdU, NeuN (neuron-specific nuclear protein) and GFAP (glial fibrillary acidic protein). BrdU injections were performed as for the cell survival assay (from day 8 to day 14), and mice were continuously exposed to free choice ethanol 10 % (or water only) up to sacrifice and transcardial perfusion with 4% PFA on day 42. Primary antibodies used were: rat anti-BrdU (AbC 117-7513, AbCys), mouse anti-NeuN (MAB377, Chemicon, Millipore, Molsheim, France) and rabbit anti-GFAP (Z0334, DAKO, Trappes, France). Secondary antibodies were: biotinylated rabbit anti-rat IgG coupled with streptavidin-Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Saint Aubin, France), cy5-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson Immunoresearch, Interchim, Montluçon, France) and Alexa-Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies). Sections were mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Paris, France). Triple immunofluorescent staining was analyzed by confocal microscopy (SP5, Leica). Survival and neuron/glia phenotype of BrdU labeled cells were determined by counting BrdU immunoreactive nuclei only and BrdU/NeuN or BrdU/GFAP double immunolabeling (in 100 cells for each mouse), respectively.

To evaluate cell death, pyknotic nucleus cells were labeled using cresyl-violet staining. All cells with darkly stained and spherical nucleus were considered as pyknotic cells.⁵

Reverse transcription (RT) and quantitative PCR

For these assays, total mRNA was extracted using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer's instructions. RT was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the following protocol: 25°C, 10 min; 37°C, 2 h; 85°C, 5 s. One series of amplification

reactions was performed with Absolute SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, Illkirch, France) using the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycling protocol: 95°C, 15 min; followed by 40 cycles of 95°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s. Primers used are listed in Table S1 and analysis of *Bdnf* expression was performed according to the nomenclature of Aid *et al.*⁷ Gene expression was normalized by reference to the housekeeping genes *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt)* and β -*actin*. The second series of gene expression determinations was made using TaqMan (Applied Biosystems) gene expression assays (see Table S2) according to the following protocol: 50 °C, 2 min; 95 °C, 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min. Gene expression was normalized by reference to the housekeeping genes *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)* and β -*actin*. The $2^{\Delta\Delta CT}$ (Delta-Delta Comparative Threshold) method was used to quantify the fold change in “ethanol” compared to “water” mice, for both qPCR technologies.

Immunohistochemistry

Coronal sections of 20 μ m thickness were collected at the hippocampus level using a cryostat between the planes “Bregma – 1.22 mm” and “ Bregma – 2.30 mm”.⁸ Sections were mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Scientific) and stored at -20°C. They were then fixed with 4% PFA for 10 min, rinsed twice in PBS and preincubated for 1 h in PBS containing 5% goat serum (or rabbit serum for BDNF immunostaining), 0.4% BSA and 0.1 % Tween 20, before overnight incubation at 4°C with one of the following antibodies: anti-BDNF (G1641, Promega, Charbonnières, France), anti-H3Ac (06-599, Millipore), anti-H3K4me3 (04-745, Millipore), anti-H3K27me2 (ab24684, Abcam, Paris, France), anti-H4Ac (06-866, Millipore), diluted in PBS containing 2% goat serum (or rabbit serum for BDNF immunostaining), 0.1% BSA and 0.1 % Tween 20. Sections were rinsed twice in PBS containing 0.1% Tween 20 (washing buffer), then incubated 1 h with biotinylated anti-rabbit IgG (111-066-003, Jackson ImmunoResearch), or biotinylated anti-chicken IgG (303-065-003, Jackson ImmunoResearch) for BDNF immunostaining, in PBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween 20. They were rinsed three times with the washing buffer, then incubated 50 min in PBS with ABC staining kit (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories) supplemented extemporaneously with 0.05% Tween 20. Sections were rinsed 3 x 10 min in the washing buffer, then once 10 min in PBS before addition of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma FASTTM, D4293, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Reactions were stopped by 3 x 5 min washing in PBS. Sections were finally dehydrated, and covered with Eukitt. Pictures were taken under optic microscope

(Olympus BX21, zoom 4, 20 and 40) and optical density (O.D.) was measured and normalized using ImageJ software.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis

Tissues were first treated with 1% PFA for 15 min, before the addition of glycine (125 mM final concentration) for a 10 min incubation at room temperature to stop PFA crosslinking. Tissues were then washed three times in PBS and homogenized in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.1) containing protease inhibitors (PIC, Protease Inhibitor Cocktail; 12505200, Roche, Meylan, France). Homogenates were kept at 0°C for 10 min before sonication with Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Liège, Belgium) using the following program: intensity High, 30 s ON/30 s OFF, 18 min, 4°C. Samples were then centrifuged at 18,000 g for 10 min at 4°C, and supernatants were collected to be diluted ten times in the ChIP dilution buffer (167 mM NaCl, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1) supplemented with PIC. The resulting chromatin solution was pre-cleared with 60 µL of protein A-agarose (20334, Pierce, Thermo Scientific) blocked with sonicated salmon sperm DNA (201190, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) for 1 h at 4°C and centrifuged 2 min at 450 g. Twenty microliters of supernatants were saved as “INPUT” for later normalization and mixed with 80 µL of ChIP dilution buffer for storage at -20°C. Chromatin was immunoprecipitated overnight at 4°C. Control samples were incubated without antibody. DNA-histone complex was extracted by binding to salmon sperm DNA blocked-protein A-agarose beads (60 µL) for a 3 h incubation at 4°C. The beads then proceeded for successive 5 min washes in Low Salt buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), in High Salt buffer (500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1), in LiCl Wash buffer (0.25 M LiCl, 1% IGEPAL-CA630, 1% deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.1) and finally twice in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA-histone complexes were removed from protein A-agarose beads by 15 min incubation at room temperature with elution buffer (0.1 M NaHCO₃, 1 % SDS). Eluates and “INPUT” were then incubated overnight at 65°C with NaCl (final concentration 0.2 M) to dissociate DNA and histones. Histones were digested by proteinase K (20 µg) for a 2 h incubation at 45°C, and DNA was extracted by adding an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol, then precipitated with 100 % ethanol and 20 µg glycogen for 2 h at -20°C. Pellets were washed with 70 % ethanol and suspended in 30 µL of water. Immunoprecipitation and semi quantitative PCR are described in the text of the article.

Supplementary References

- 1 Tordoff MG, Bachmanov AA. Influence of the number of alcohol and water bottles on murine alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; **27**: 600-606.
- 2 Kelai S, Renoir T, Chouchana L, Saurini F, Hanoun N, Hamon M *et al.* Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 2008; **107**: 1660-1670.
- 3 Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 1993; **112**: 503-510.
- 4 Crabbe JC, Metten P, Ponomarev I, Prescott CA, Wahlsten D. Effects of genetic and procedural variation on measurement of alcohol sensitivity in mouse inbred strains. *Behav Genet* 2006 ; **36**: 536-552.
- 5 Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, Melfort M, Gabriel C *et al.* Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; **13**: 759-774.
- 6 He J, Nixon K, Shetty AK, Crews FT. Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur J Neurosci* 2005; **21**: 2711-2720.
- 7 Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 2007; **85**: 525-535.
- 8 Franklin KB, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego, California, USA, 1997.

Supplementary tables

Experiments	Ethanol consumption (g/kg/day) during stabilization period with 10% ethanol in drinking water	Total fluid consumed (g/kg/day)	Number of mice	
Immuno-histochemistry	9.42 ± 0.57	140.50 ± 13.62	Water n=6 Ethanol n=9	
RT-qPCR	9.17 ± 0.62	140.00 ± 17.84	Water n=6 Ethanol n=9	
Protein analysis (Western Blot/ELISA)	10.60 ± 0.53	135.30 ± 10.25	Water n=6 Ethanol n=9	
ChIP	10.48 ± 0.45	146.30 ± 14.15	Water n=6 Ethanol n=9	
Neurogenesis	2 weeks: 10.24 ± 0.99 4 weeks: 9.25 ± 0.33	149.50 ± 9.80 144.30 ± 8.79	Water 2 weeks n=6 Ethanol 2 weeks n=9	Water 4 weeks n=6 Ethanol 4 weeks n=9
ANA-12	Ethanol vehicle-treated: 9.54 ± 0.88 Ethanol ANA12-treated: 8.87 ± 0.77	139.50 ± 17.70 134.00 ± 13.53	Water vehicle-treated n=6 Ethanol vehicle-treated n=9	Water ANA12-treated n=6 Ethanol ANA12-treated n=9

Table S1: Ethanol intake and total fluid consumed in the different groups of mice with free access to 10% ethanol that had been included in the various experimental series.

mRNA expression analysis		
Genes	5' primer	3' primer
<i>Gdnf</i>	TGGGTTTGGGCTATGAAACC	AACATGCCTGGCCTACTTTG
<i>Fgf-1</i>	GCGGTCCTCGGACTCACTA	AGCCAATGGTCAAGGGAAC
<i>Fgf-2</i>	TATGAAGGAAGATGGACGGC	TCGTTTCAGTGCCACATACC
<i>Trkb</i>	TGGACCACGCCAACTGACATT	GAATGTCTCGCCAACTTGAG
<i>Bcl-2</i>	ATGACTGAGTACCTGAACCG	ATGCTGGGGCCATATAGTTC
<i>Bdnf I</i>	GTGTGACCTGAGCAGTGGGCAAAGGA	-
<i>Bdnf II</i>	GGAAGTGGAAGAAACCGTCTAGAGCA	-
<i>Bdnf III</i>	GCTTTCTATCATCCCTCCCCGAGAGT	-
<i>Bdnf IV</i>	CTCTGCCTAGATCAAATGGAGCTTC	-
<i>Bdnf V</i>	CTCTGTGTAGTTTCATTGTGTGTTC	-
<i>Bdnf VI</i>	GCTGGCTGTCGCACGGTTCCCATT	-
<i>Bdnf VII</i>	CCTGAAAGGGTCTGCGGAACTCCA	-
<i>Bdnf VIII</i>	GTGTGTGTCTCTGCGCCTCAGTGGA	-
<i>Bdnf IX</i>	TGCAGGGGCATAGACAAAAG	TGAATCGCCAGCCAATTCTC
<i>BDNF Rev</i>	-	GAAGTGTACAAGTCCGCGTCCTTA
<i>Hprt</i>	GATGATGAACCAGGTTATGAC	GTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG
<i>β-actin</i>	CCACCATGTACCCAGGCATT	CGGACTCATCGTACTCCTGC

Table S2: Primer sequences used for quantitative real-time PCR analysis of mRNAs with Absolute SYBR Green technology.

mRNA expression analysis	
Genes	References
<i>Mecp2</i>	Mm01193537_g1
<i>Mbd1</i>	Mm01262472_g1
<i>Ncor</i>	Mm00448681_m1
<i>Hdac1</i>	Mm02745760_g1
<i>Hdac2</i>	Mm00515108_m1
<i>Hdac3</i>	Mm00515916_m1
<i>Hdac4</i>	Mm01299565_m1
<i>Hdac5</i>	Mm00515941_g1
<i>Hdac9</i>	Mm00458454_m1
<i>Mash1</i>	Mm03058063_m1
<i>Neurod1</i>	Mm01280117_m1
<i>Neurog1</i>	Mm00440466_s1
<i>Neurog2</i>	Mm00437603_g1
<i>Id2</i>	Mm01293217_g1
<i>Id3</i>	Mm00492575_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

Table S3: References of primers used for quantitative real-time PCR analysis of mRNAs with Taqman technology.

ChIP analyses		
Gene promoters	5' primer	3' primer
<i>Bdnf PII</i>	GGGGTGGAGAGGGTAAGAGT	GTTTTGTCACGTGTGGATGG
<i>Bdnf PIII</i>	TATCCCTGCCTCCCTCTCTT	CGGGGAGGGATGATAGAAAG
<i>Bdnf PVI</i>	AAATGGAGAGAAGCCAGTGC	TCTTCGGTTGAGCTTCGATT
<i>Bdnf PVIII</i>	TGACCCACATGGATTGTGAC	TGGAGAAAAC TGGTGGTTCC
<i>Gapdh</i>	CTCCCAGGAAGACCCTGCTT	GGAACAGGGAGGAGCAGAGA

Table S4: Primer sequences used for ChIP analyses.

Gene	Water	Ethanol	Percent over Water	P value
<i>Mecp2</i>	1.005 ± 0.040 (6)	1.278 ± 0.051 (8)	+27.16	***
<i>Mbd1</i>	1.005 ± 0.038 (6)	1.076 ± 0.055 (8)	+7.06	ns
<i>Ncor</i>	1.005 ± 0.049 (6)	0.788 ± 0.050 (8)	-21.59	**
<i>Hdac1</i>	1.003 ± 0.027 (6)	0.798 ± 0.059 (9)	-20.44	**
<i>Hdac2</i>	1.000 ± 0.026 (6)	0.822 ± 0.029 (9)	-17.80	*
<i>Hdac3</i>	1.005 ± 0.048 (6)	0.954 ± 0.042 (9)	-5.07	ns
<i>Hdac4</i>	1.003 ± 0.040 (6)	1.169 ± 0.027 (8)	+16.55	ns
<i>Hdac5</i>	1.008 ± 0.029 (6)	0.715 ± 0.030 (8)	-29.07	*****
<i>Hdac9</i>	1.000 ± 0.024 (6)	1.025 ± 0.041 (8)	+2.50	ns

Table S5: Effects of chronic ethanol intake on hippocampal levels of mRNAs encoding transcriptional repressors.

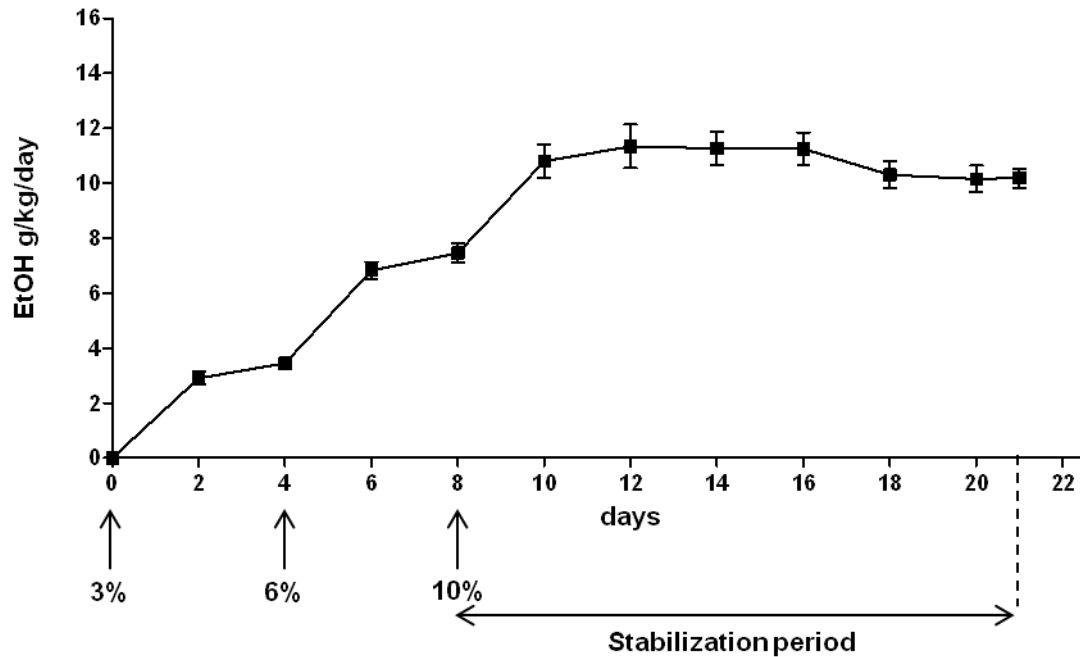
mRNA levels were measured by real-time RT-qPCR in the hippocampus of “water” and “ethanol” mice. Results [mean ± S.E.M. of (n) mice] are expressed as arbitrary units after normalization to the endogenous reference genes encoding *Gapdh* or *Hprt* and β -actin. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ***** p < 0.0001, significantly different in “ethanol” versus “water” mice, ns: not significant, one way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison test.

Gene	Water	Ethanol	Percent over Water	P value
<i>Mash1</i>	0.941 ± 0.069 (6)	0.750 ± 0.041 (7)	-20.30	ns
<i>Neurod1</i>	1.003 ± 0.034 (6)	1.151 ± 0.045 (8)	+14.76	ns
<i>Neurog1</i>	1.012 ± 0.075 (6)	1.238 ± 0.062 (8)	+22.33	ns
<i>Neurog2</i>	1.020 ± 0.088 (6)	1.340 ± 0.094 (8)	+31.37	**
<i>Id2</i>	1.017 ± 0.083 (6)	1.171 ± 0.034 (7)	+15.14	ns
<i>Id3</i>	1.054 ± 0.102 (6)	0.771 ± 0.064 (7)	-26.85	*

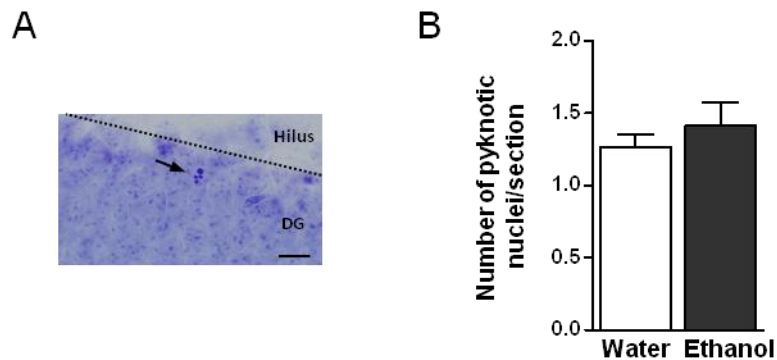
Table S6: Effects of chronic ethanol intake on hippocampal levels of mRNAs encoding transcription factors of the bHLH family.

mRNA levels were measured by real-time RT-qPCR in the hippocampus of “water” and “ethanol” mice. Results [mean ± S.E.M. of (n) mice] are expressed as arbitrary units after normalization to the endogenous reference genes encoding *Gapdh* or *Hprt* and β -actin. * p < 0.05, ** p < 0.01 significantly different in “ethanol” versus “water” mice, ns: not significant, one way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison test.

Supplementary figures

**Figure S1**

Ethanol consumption by C57BL/6J mice during the 21 day free-choice period. Mice were offered 3% v/v ethanol (EtOH) versus water for 4 days, then 6% ethanol versus water for the next 4 days, and finally animals had access to 10% ethanol versus water for the subsequent 13 days (stabilization period). Positions of the tubes filled with ethanol or water were changed every two days to avoid possible preference bias. Food (standard mouse pellets A03; UAR, Strasbourg, France) was given ad libitum. Absolute grams of ethanol intake/kg body weight/24 h were determined for each mouse. Each point is the mean $\pm$ S.E.M. of 36 independent determinations. During the stabilization period, daily ethanol quantity consumed was 10.76 ± 0.20 g/kg/day (mean $\pm$ S.E.M., $n = 36$).

**Figure S2**

Cell death in the dentate gyrus is not affected by chronic and voluntary ethanol consumption. (A) Arrow, pyknotic nucleus in the dentate gyrus (DG). Scale bar: 10 μ m. (B) Number of pyknotic nuclei per hippocampal section in “water” and “ethanol” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 4$ (“water”) and $n = 8$ (“ethanol”) mice.

ARTICLE 2

Chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induces cognitive deficits, and alterations in BDNF signaling and epigenetic regulation

En préparation

Les conséquences cellulaires et fonctionnelles de la consommation chronique d'éthanol chez les souris C57BL/6J

Dans l'étude précédente, nous avons démontré que la consommation chronique et volontaire d'éthanol chez les souris C57BL/6J induisait des modifications épigénétiques sur le gène du BDNF. Ces altérations conduisaient à une augmentation de l'expression protéique du BDNF, responsable de la stimulation de la neurogenèse hippocampique par l'activation du récepteur TrkB. Cette seconde étude a pour but d'étudier plus en profondeur les conséquences épigénétiques et fonctionnelles de la plasticité induites par la prise chronique d'éthanol.

L'analyse du profil de méthylation du gène du BDNF a révélé une diminution globale de la méthylation de l'ADN dans les sous-régions CA1 et CA3 de l'hippocampe sans affecter le DG. Nous avons montré que les différentes signalisations en aval du récepteur TrkB étaient altérées à la suite de la prise d'éthanol. La prise chronique d'éthanol en libre choix stimule la phosphorylation de AKT, de ERK et de CREB. Il est donc probable que la diminution de la méthylation du gène du BDNF participe à l'augmentation de son expression protéique, conduisant à une augmentation de l'activation du TrkB et donc des signalisations en aval, ce qui concourt à stimuler la neurogenèse hippocampique.

Afin de déterminer si la neurogenèse induite par la prise chronique d'éthanol influence les capacités cognitives et émotionnelles de ces animaux, nous avons conduit une série d'expérimentations comportementales. Nous avons observé que la coordination motrice, l'activité locomotrice ainsi que les comportements reliés à l'anxiété n'étaient pas modifiés après 3 semaines d'alcoolisation, mais que cette consommation diminuait le comportement de désespoir mesuré dans un test de dépression. L'analyse des fonctions cognitives a révélée que les souris « éthanol » avaient une détérioration à la fois de l'apprentissage et de la mémoire à long terme. De façon surprenante, ces altérations de performances cognitives ne sont pas reliées à des modifications de la LTP enregistrée au niveau de CA1 dans l'hippocampe.

En conclusion, la modification de la méthylation du gène du BDNF participe probablement à l'augmentation de son expression provoquée par l'éthanol. Ce processus déclenche l'activation des voies de transduction intracellulaire dépendantes de l'activation du récepteur TrkB. Cependant, ces modifications cellulaires entraînant probablement l'augmentation de la neurogenèse hippocampique, sont corrélées à une altération de l'apprentissage et de la mémoire dépendante de l'hippocampe. Ces données suggèrent que l'induction d'une neuroplasticité par l'éthanol semble être une réponse adaptative aux détériorations cognitives provoquées par la prise chronique d'éthanol.

Chronic ethanol consumption in C57BL/6J mice induces cognitive deficits, and alterations in BDNF signaling and epigenetic regulation

ABSTRACT

High ethanol consumption has been shown to induce severe cognitive deficits in mice associated with hippocampal damages. However, we recently reported that chronic and free-choice ethanol consumption in C57BL/6J mice stimulated BDNF expression in response to chromatin remodeling within *Bdnf* promoters, leading to hippocampal neurogenesis activation. In order to further analyze the consequences of ethanol intake in C57BL/6J mice, a series of cellular and behavioral studies were performed. A three week chronic free choice ethanol consumption in these mice lead to altered learning and memory capacities analyzed by the novel object recognition task and in fear conditioning test, suggesting hippocampus-dependent memory impairments. In addition, ethanol decreased DNA methylation within *Bdnf* gene in the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus, and upregulated BDNF signaling pathway involving ERK, AKT and CREB. These data further demonstrated the role of epigenetic mechanisms in the effects of ethanol consumption on BDNF expression and support the idea that enhanced BDNF intracellular signaling pathways could counteract the learning and memory deficits induced by ethanol intake.

Keywords: BDNF signaling, DNA methylation, hippocampus, learning, long-term potentiation, memory

INTRODUCTION

Chronic ethanol consumption as well as acute exposure to ethanol in both humans and rodents has been shown to induce deficits in learning and memory, probably linked to the hippocampus damages observed after ethanol intoxication (Bowden and McCarter, 1993; Melis *et al.*, 1996; Ryabinin, 1998; Ryabinin *et al.*, 2002). The hippocampus, which is one of the main brain structure implicated in cognitive tasks, is particularly sensitive to ethanol-induced seizures (Franke *et al.*, 1997; Alijan-pour *et al.*, 2012) and to ethanol-induced alterations such as modifications in long-term potentiation (LTP) within the dentate gyrus (DG) and CA1 subfield (Wayner *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 2008).

It has been recently shown that brain adaptations resulting from chronic ethanol consumption are in part under the control of epigenetic regulations (Robison and Nestler, 2011). DNA methylation that consists in the addition of a methyl group

on cytosine at CpG sites leading to transcriptional gene repression (Karpova, 2013), is one of the epigenetic mechanisms which have been associated with alcohol dependence (Bonsch *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013). Compelling studies have demonstrated that DNA methylation and DNA methyltransferase enzymes (DNMT) were strongly impacted by ethanol in alcoholics patients (Bonsch *et al.*, 2004; Bonsch *et al.*, 2005; Bonsch *et al.*, 2006; Warnault *et al.*, 2013). Interestingly, a recent study reported that, in mice, DNA methylation inhibition could prevent excessive alcohol consumption (Warnault *et al.*, 2013). Epigenetic regulations of gene transcription, and in particular that of the trophic factor *Bdnf*, have also been shown to play a role in cognitive performances. The decrease in *Bdnf* methylation linked to memory enhancement strongly suggests that epigenetic modification within *Bdnf* gene could be a mechanism involved in memory consolidation in rats (Lubin *et al.*, 2008).

Because chronic ethanol exposure leads to brain adaptations involving DNA methylation, which is implicated in the modulation of cognitive performances through BDNF regulation, it was then hypothesized that epigenetic mechanisms within *Bdnf* gene could underly the cognitive deficits observed after chronic ethanol consumption.

BDNF binds to different receptors and in particular TRkB receptors whose cellular pathway involves the activation of several kinases. Among them, ERK/CREB signaling pathway and CREB phosphorylation have been shown to be inhibited in several brain areas by ethanol exposure (Pandey *et al.*, 2005, Pandey *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 1998a,b). Furthermore, an increase in AKT activation has also been reported in the hippocampus of ethanol-avoiding but not ethanol-preferring rats (Nuutinen *et al.*, 2011). As these signaling pathways controlled by BDNF are also involved in the regulation of cognition (Subbanna *et al.*, 2013, Stuchlik, 2014) and anxiety-like behaviors (Pandey *et al.*, 2005, Moonat *et al.*, 2010), they could exert a central role in ethanol-induced behavioral, structural and functional adaptations in the brain.

We recently reported that in adult C57BL/6J mice, which display high ethanol preference, chronic free choice ethanol consumption induced chromatin remodeling at histone level within the different *Bdnf* promoters through post-translational histone modifications leading to BDNF stimulation at hippocampal level (Stragier *et al.*, 2014). In order to further address the functional and epigenetic consequences of the ethanol-intake, we analyzed DNA methylation, BDNF signaling and hippocampus-related behaviors after chronic free choice ethanol intake in these mice. We showed that ethanol consumption in C57BL/6J mice decreased DNA methylation within the *Bdnf* gene in CA1 and CA3 subfields of the hippocampus, upregulated BDNF

intracellular signaling pathway, and that these cellular modifications were associated to alterations in learning and memory. These data suggested that the ethanol-induced neuroplasticity could be an adaptive response to the cognitive impairments induced by ethanol intake.

MATERIALS AND METHODS

Animals and the free-choice ethanol paradigm

Adult male (8 week-old) C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) were housed under standard laboratory conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% relative humidity, 12–12 h light–dark cycle, food and water ad libitum) for at least one week before starting a free-choice ethanol paradigm described in details elsewhere (Kelai *et al.*, 2008; Molet *et al.*, 2012, Stragier *et al.*, 2014). Briefly, mice were housed singly in standard laboratory cages (Macrolon type 2, 22 x16 x14 cm) equipped with four tubes (20 mL), one containing tap water and the other three filled with ethanol dilutions in water for “ethanol” mice, while all tubes were filled with tap water for “water” mice. Previous data (Tordoff *et al.*, 2003; Kelai *et al.*, 2008) indicated that, in these conditions, the amount of ethanol ingested daily was slightly but regularly larger than the amount ingested when only one bottle of ethanol was offered versus one bottle of tap water. Animals had continuous free access to the drinking tips of tubes. “Ethanol” mice were exposed progressively to increasing concentrations of ethanol (0–10% ethanol in water within 21 days) under the free-choice procedure described by Kelai *et al.* (Figure S1). Briefly, mice were offered 3% ethanol (v/v) versus water for 4 days, then 6% ethanol versus water for the next 4 days, and finally animals had access to 10% ethanol versus water for the subsequent 12 days (stabilization period). Food (standard mouse pellets A03; UAR, Strasbourg, France) was given ad libitum. Absolute amounts of ethanol (as grams) consumed

and total fluid (grams of ethanol solution plus tap water) intake/kg body weight/24 h were determined for each mouse. Mice were sacrificed between 10:00 and 12:00 am on day 21, trunk blood samples were taken and blood ethanol concentrations were determined using a chemical analyser (Dimension[®] Xpand[®] Plus, Dade Behring, Paris, France).

Separate groups of mice were subjected to the free-choice ethanol paradigm and used for each series of determinations (except where indicated; see below). The number of mice used and the quantity of ethanol consumed for each set of experiments are indicated in Table S1.

All experiments were performed in strict conformity with institutional guidelines in compliance with French and European Communities Directives for use of animals in biomedical research. (Service de Protection et Santé Animales, Préfecture de Police, Authorization # B-75-977, Directive 2010/63/UE, 22/09/2010 protocol authorization #00966.02).

Behavioral testing

All behavioral testing were conducted at the end of the free-choice ethanol paradigm (i.e. the 21st day). During the different testing phases, animals were allowed to have continuously access to ethanol and water for “ethanol” mice and water only for “water” mice.

Open field test

The apparatus consisted of four open boxes (50 x 50 cm) separated by white wood walls and equipped with an infrared floor for the measurement of exploratory behavior. The arena was subdivided into a central and a peripheral zone. Mice were placed in the open field boxes for 15 min under normal light conditions, and the exploratory behavior of the animals was automatically measured with a video tracking system (Viewpoint, Lyon, France). Both the time spent and the distance covered in the different zones were scored.

Forced swim test

FST was conducted as previously described (Porsolt *et al.*, 1977). Briefly, mice were placed individually into Plexiglas cylinders (25 cm tall x 15 cm in internal diameter) filled with water (25 ± 1°C) to a depth of 15 cm under low light conditions and the behavior was measured using a video tracking system for 6 min (Viewpoint). The outcome measured was the “immobility” reflecting no movement at all and/or minor movement necessary to keep the head above the water.

Accelerating rotarod test

Motor coordination and equilibrium were tested on an accelerating rotarod (Rotarod, Bioseb, Vitrolles, France). After training at constant speed (4 rpm, 2 min), three 5 min trials were performed with 5 min intertrial intervals. During these latter trials, mice were placed on a rotating rod (3 cm diameter) that accelerated from 4 to 40 rpm in 5 min, and the time until they fell from the rod was recorded.

Spontaneous locomotor activity

Locomotor activity was measured using a computer-based photo beam apparatus. The actimeter box (area: 300 x 150 mm², 180 mm height, with Plexiglas wall and grid floor) detected mouse movements by means of two infrared light beams. Mice were placed in the testing apparatus during 1 hour. Both ambulation, corresponding to the number of squares crossed in the periphery and the center of the actimeter, and rearings, corresponding to the number of times the mouse stands on its hind feet, were recorded.

Novel object recognition tests

The novel object recognition (NOR) task chamber was a black PVC arena (30 x 30 x 30 cm) and the objects used were made in easy-to-clean plastic materials, having a size of about 4x10x4 cm, were selected on the basis of preference tests. Room lighting was kept at 15 lux. Mice were given a 2

day habituation session in the testing chamber for 15 min. 24 h later, during the first phase (*acquisition phase*), two identical objects (A and A') were set in the right and left corners of the box, at a distance of 7 cm from the walls. A mouse was placed in the testing chamber and was allowed to freely explore the objects for 5 min. The mouse was then replaced in its home cage. 1 hour after, the mouse returned in the testing chamber where one of the two objects (A') was replaced by a novel one (B). The mouse was allowed to freely explore for 5 min (*recognition phase, 1*). The same procedure was replicated after a 24-hour interval: the mouse was back to the testing chamber with two objects: one was the same than during the acquisition phase (A) and a novel (C) object replaced A' (*recognition phase, 24*). The mouse was allowed to explore the chamber for 5 min. For each mouse, the time spent interacting with each object during the recognition phases 1 and 24 was video-recorded. The recognition index (RI) was calculated as follow: (time spent exploring the novel object / total time spent exploring the two objects) x 100. Animals able to discriminate between the old and new object should have a recognition index above 50%.

Fear conditioning test

The fear conditioning paradigm consisted into 3 consecutive days of behavioral testing and was conducted in an operant chamber (length 26 cm x wide 18 cm x high 22 cm), housed in a sound-attenuating box, with aluminum sidewalls and Plexiglas rear and front walls, and a stainless steel grid floor (MED Associates, St. Albans, VT). On the first day, a mouse was placed into the dark conditioning chamber with vanilla odor and allowed to acclimate for 3 min. Then, a tone (conditioned stimulus, CS) of 2 500 Hz frequency and 85 dB intensity was presented for 30 sec and immediately after, a shock (unconditioned stimulus, US) of 0.75 mA for 2 sec was given, followed by

an inter-trial interval (ITI) of 2 min. The cycle CS-US-ITI was repeated six times. For the contextual fear conditioning test, mice were returned to the same chamber used for the conditioning trial, 24 hours after the conditioning phase, and allowed to explore for 20 min without presentation of CS or US. The third day, the mice were tested for cued fear memory by returning to the chamber with several modifications in order to change the context (no vanilla odor, modification of designs to the walls as well as light into the chamber). Only the CS was presented ten times, separated by an ITI of 2 min. All sessions were recorded using infrared cameras and controlled by computerized system interface (MED Associates). Freezing behavior, defined as complete absence of voluntary movements except for respiration, was measured manually every 2 sec and expressed as percentage of time spent in freezing.

Reverse transcription (RT) and quantitative PCR

At the end of the free-choice ethanol or water exposure (day 21), animals were sacrificed by cervical dislocation and hippocampi were quickly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until real time RT-qPCR determinations. For these assays, total mRNA was extracted using NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer's instructions. RT was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the following protocol: 25°C, 10 min; 37°C, 2 h; 85°C, 5 s. The amplification reactions were performed with KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Clinisciences, Nanterre, France) using the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycling protocol: 95°C, 3 min; followed by 40 cycles of 95°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s. Primers used are listed in Table S2. Gene expression was normalized by reference to the housekeeping genes

hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) and β -actin. The $2^{\Delta\Delta CT}$ (Delta-Delta Comparative Threshold) method was used to quantify the fold change in “ethanol” compared to “water” mice.

Immunoblotting

Mice were sacrificed as above and bilateral hippocampi were rapidly dissected out and then stored at -80°C until use. Total proteins were extracted using a lysis buffer (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, 0.5% Triton X-100) containing freshly prepared protease and phosphatase inhibitors (PIC: Protease Inhibitor Cocktail, 12505200, Roche, Meylan, France; sodium orthovanadate 2 mM and sodium fluoride 2 mM). Samples were sonicated and centrifuged at $14,000 \times g$ for 30 min at 4°C . Supernatants were removed and frozen at -20°C until western blotting experiments. The protein content in supernatants was measured using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf France). Proteins (50 μg) were electrophoresed in duplicate in a 4-12% Bis-Tris gel (Novex, Life Technologies, Saint Aubin, France), then electrically transferred from the gel to a nitrocellulose membrane (Novex, Life Technologies) using the iBlot System (Novex, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Membranes were saturated 1 h at room temperature with 5% BSA (w/v) in Tris-buffered Saline with 0.1% Tween-20 (TBST) then incubated overnight with one of the primary antibodies: anti-ERK1/2 (05-1152, Millipore, Molsheim, France), anti-P-ERK1/2 (M9692, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), anti-AKT1/2/3 (9272S, Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France), anti-P-AKT1/2/3 (4051S, Cell Signaling, Ozyme), anti-CREB (4820S, Cell Signaling, Ozyme), anti-P-CREB (9198S, Cell Signaling, Ozyme) or β -actin (SC-81178, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) diluted in TBST with 5% BSA. After

extensive washing in TBST buffer, membranes were incubated with anti-rabbit IRdye 800CW-coupled IgG (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) or anti-mouse IRdye 700DX-coupled IgG (Rockland Immunochemicals). Fluorescence of the immunoblots was analysed at 800 nm and 700 nm using an Odyssey infrared imager (Li-Cor, Lincoln, NE). The relevant immunoreactive bands were quantified using ImageJ software and normalized with the total protein expression. Data normalized for each blot were expressed as percentage of “water” mice.

Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

Immediately after cervical dislocation (on day 21 of the alcohol/water free choice paradigm), brains were removed, frozen in isopentane at -35°C . Coronal sections of 40 μm thickness were collected at the hippocampus level using a microtome (HM450, MM France, Francheville, France), between the planes “Bregma – 1.22 mm” and “Bregma – 2.30 mm” (Franklin and Paxinos, 1997). Sections were mounted on polyethylene naphthalate membrane slides (Zeiss, Le Pecq, France). After a 3 min dry, sections were stained with Hematoxylin (15 sec) then rinsed in distilled water (2-3 sec), stained with Eosin (25 sec), successively deshydrated with 50%, 70% and absolute ethanol (1 min), and allowed to dry for 3 min. Laser-assisted microdissection was performed on a PALM Microbeam Zeiss instrument with a PALMRobo software (Zeiss). Micro-dissected tissues from the hippocampus (dentate gyrus [DG], Ammon's horn 1 and 3 [CA1 and CA3]) were suspended into a lysis buffer from the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) and genomic DNA (gDNA) was extracted following manufacturer's instructions. gDNA concentration was measured using a Nanodrop (Fisher Scientific, Illkirch, France) and 2 μg of gDNA was used to perform MeDIP. gDNA was diluted in

Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) and sonicated using a Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Liège, Belgium) with the following program: intensity High, 30 s ON/30 s OFF, 5 min, 4°C. The DNA solution was heat-denatured for 10 min at 95°C, immediately cool on ice for 5 min and 100 µL of 5X Immunoprecipitation buffer (IP) (50 mM phosphate buffer pH 7.0, 700 mM NaCl, 0.25% Triton X-100) was added. The resulting DNA solution was pre-cleared with 30 µL of magnetic beads, previously blocked with 0.5% BSA, for 1 hour at 4°C. 80 µL of supernatants were saved as “INPUT” for later normalization and stored at -20°C until protein digestion. Methylated DNA was incubated overnight at 4°C with antibody against 5-Methylcytidine (BI-MECY, Eurogentec, Angers, France). DNA-antibody complexes were immunoprecipitated by adding 30 µL of magnetic beads and incubated 2 hours at 4°C, then the beads were washed three times with 1 mL of 1X IP buffer for 5 min at 4°C. The beads were resuspended in 250 µL of digestion buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) and the 80 µL of INPUT in 170 µL of the same buffer. 30 µg of proteinase K was added to both beads and INPUT and incubated overnight at 56°C. DNA was extracted using a phenol / chloroform / isoamyllic alcohol method. DNA was then precipitated by adding 500 µL of absolute ethanol, 20 µL 5M NaCl and 20 µg glycogen and incubated 2 hours at -20°C. Pellets were washed with 70 % ethanol and suspended in 30 µL of water. 1 µL of immunoprecipitated DNA and input was used to QPCR analysis with BDNF CpG islands primers listed in Table S3 and with the following program using KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Clinisciences): 95°C, 3 min; followed by 40 cycles of 95°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 30 s. The ratio DNA immunoprecipitated/INPUT was then established to define the

enrichment of methylated DNA for each CpG island.

Long-term potentiation (LTP) experiments

Preparation of hippocampal slices

Hippocampal slices were obtained as described previously (Mlinar *et al.*, 2006; 2008). In brief, mice were anesthetized with isoflurane and decapitated. Hippocampi were rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF), which contained the following (in mM): NaCl, 124; KCl, 2.75; NaH₂PO₄, 1.25; NaHCO₃, 26; MgSO₄, 1.3; CaCl₂, 2; d-glucose 10. The solution was bubbled with a 95% O₂/5% CO₂ gas mixture (pH 7.4). Transversal hippocampal slices of 400 µm nominal thickness were cut with a McIlwain tissue chopper (Gomshall, U.K.). After discarding approximately 2 mm of the dorsal hippocampal pole, seven to nine slices were cut. All slices were kept in a multi-well incubation chamber for at least 1 h at room temperature until recording.

Electrophysiological recordings

Before transferring to the recording chamber, a single slice was temporarily transferred to a Petri dish, where the area CA1 was disconnected from the area CA3 by a surgical cut. The slice was then placed on a nylon mesh, completely submerged in a recording chamber and continuously superfused (2 ml min⁻¹) with oxygenated ACSF at 32–33 °C. Slices were incubated for 15 min in the recording chamber before initiating electrical stimulation. Synaptic responses of CA1 pyramidal neurons were elicited by stimulation of the Schaffer collateral/commissural pathway. Stimulation pulses (80 µs duration; 15 s interpulse interval), triggered by a PC controlled by LTP230D software (Anderson and Collingridge, 2001) were delivered by a stimulus isolation unit (DS2, Digitimer, Welwyn Garden City, U.K.) through twisted bipolar nichrome electrodes. Evoked potentials were

recorded with glass electrodes filled with 150 mM NaCl (2–10 M Ω resistance) placed in the distal third of the stratum radiatum to record field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP). The distance between the stimulating and recording electrodes was 400–500 μ m. Recorded potentials were amplified with Neurolog NL 104 amplifiers (Digitimer), digitized with the sampling rate of 10 kHz (TL-1 interface, Molecular Devices, Foster City, CA) and stored in a PC for off-line analysis. At the beginning of each experiment, a stimulus–response curve (SRC), obtained by gradually increasing stimulus intensity, was recorded. The fEPSP was determined as the slope of the initial falling phase of the response recorded in the stratum radiatum. The stimulus intensity of test pulses was set to evoke a fEPSP that had an initial slope equal to 35–45% of the maximum obtained in the SRC. At least 15 min of stable responses were used to generate the baseline values. Unless otherwise stated, stimulus intensity was held constant throughout the remainder of the experiment.

LTP protocol

LTP was induced by theta-burst stimulation consisting of a single train of either 5 or 10 bursts of 5 stimuli (100 Hz intraburst frequency, 5 Hz burst frequency; called TB5 and TB10, respectively). To allow the measurement of TB5- and TB10-induced LTP in the same slice, a one-pathway stimulation protocol was applied. Input pathways were stimulated every 15 s, at the stimulus intensity set to produce fEPSPs with an initial slope of $\sim$ 45% of the maximal slope obtained from the respective stimulus–response relationship. After collection of 15 min of stable baseline responses, LTP was induced by TB5 stimulation. Test responses were followed for further 60 min, following which a SRC was recorded. Five minutes after the SRC, a TB10 stimulation was

delivered and the effect was followed for 15 min.

Statistical analyses

All values in the text and figure legends are means $\pm$ S.E.M. Data from behavioral testing were analyzed using Student's *t* test, excepted data from the novel object recognition test and the conditioning phase of the fear conditioning test which were analyzed by a two-way ANOVA (ethanol $\times$ time) with repeated measures followed by a Bonferroni's multiple comparison test when appropriated. Data from LTP experiments were analyzed using Mann-Whitney test. MeDIP assays were analyzed with a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. RT-QPCR data were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni test for multiple comparisons. Immunoblotting quantifications were analyzed using an unpaired *t* test with Welch's correction. Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Ethanol intake

Mice were offered ethanol (at increasing concentration, from 3 to 10% v/v) versus water for 21 days. Total fluid intake in the “ethanol” group (147.10 ± 13.59 g/kg/day, $n = 76$) did not differ from that of “water” group (156.30 ± 14.80 g/kg/day, $n = 59$). Daily ethanol quantity consumed reached a stable level of 10.53 ± 0.20 g/kg/day ($n = 76$) when free choice was given between water and 10% ethanol (Figure S1 and Table S1). This amount, which is in the same range than that reported in previous studies under the very same conditions than those used in our study (Belknap *et al.*, 1993; Crabbe *et al.*, 2006), was sufficient to yield blood ethanol levels near 50–70 mg/100 mL during the active drinking phase, i.e. the dark phase of the circadian cycle (see Kelai *et al.*, 2008).

However, when measured 3 hours after the light on, no more blood ethanol could be detected, as already described (Stragier *et al.*, 2014).

Methylation profile of the *Bdnf* gene after chronic and voluntary ethanol consumption

We first analyzed the mRNA expression of three enzymes involved in methylation of cytosine at the level of the CG dinucleotide within the CpG island, the DNA methyltransferase 1 (DNMT1), implicated in the maintenance of the methylation profile during the cell division and the DNA methyltransferases 3a and 3b (DNMT3a and DNMT3b) involved in the *de novo* methylation. As shown in Table 1, RT-qPCR analysis evidenced that ethanol consumption led to a significant reduction in *Dnmt3b* mRNA expression ($t_{5,38} = 2.544$, $p < 0.05$, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test) whereas neither that of *Dnmt1* nor that of *Dnmt3a* was significantly modified after ethanol consumption ($t_{5,38} = 1.035$, $p > 0.05$; $t_{5,38} = 1.853$, $p > 0.05$; respectively, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test).

The analysis of the methylation of the different CpG islands within the *Bdnf* gene was conducted by methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) after laser microdissection of the dentate gyrus (DG), and the Ammon's horn 1 and 3 (CA1 and CA3) subfields of the hippocampus. A two-way ANOVA analysis showed that, after chronic and free choice ethanol intake, DNA methylation was significantly modified in both CA1 and CA3 ($F_{(1,73)} = 21.780$, $p < 0.0001$; $F_{(1,84)} = 6.137$, $p = 0.0152$; respectively) but not in the DG ($F_{(1,84)} = 0.440$, $p = 0.5089$) (Table 2). In addition, DNA methylation within the *Bdnf* island V was significantly decreased in the CA1 of "ethanol" compared to "water" mice ($p < 0.05$, Dunn's t test, Table 2).

Effects of chronic and voluntary ethanol intake on hippocampal BDNF-TrkB signaling pathway

In order to assess the effect of ethanol on the cellular signaling cascades downstream to the BDNF TrkB receptor, we analyzed three proteins involved in the regulation of the proliferation, differentiation and survival which are a part of the neurogenesis. As shown in Fig.1, chronic and voluntary ethanol intake stimulated the phosphorylation of AKT, ERK and CREB proteins ($p = 0.008$, $p = 0.045$, $p = 0.015$; respectively, unpaired t test). We also evidenced an increase in CREB protein expression after ethanol consumption ($p = 0.0004$, unpaired t test) whereas AKT and ERK protein expression were not modified ($p = 0.711$, $p = 0.493$; respectively, unpaired t test).

Effects of chronic and voluntary ethanol intake on depressant- and anxiety-like behaviors, locomotor activity and coordination

The behavioral consequences of the chronic ethanol consumption were analyzed using the forced swim test. Results presented in Fig.2A showed that chronic ethanol intake induced a decrease in the time spent in immobility in the forced swim test ($p = 0.027$, Student's t test). The measurement of the spontaneous activity in the actimeter did evidence a difference between "ethanol" and "water" mice neither for the locomotor activity, the number of rearings nor the number of beam crossing ($F_{(1,143)} = 0.302$, $p > 0.05$; $F_{(1,143)} = 0.003$, $p > 0.05$; $F_{(1,143)} = 0.070$, $p > 0.05$; respectively, repeated measures, two-way ANOVA, Fig.2B). Accordingly, the distance covered by the mice and the time spent in the central area of the open field was not modified in "ethanol" compared to "water" mice ($p = 0.260$, $p = 0.731$; respectively, Student's t test, Fig.2C) suggesting that chronic free choice ethanol intake induced neither anxiogenic nor anxiolytic behavior. Finally, no difference was found in the three

successive trials in the accelerating rotarod in “ethanol” compared to “water” mice ($F_{(1,32)} = 0.462$, $p > 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA, Fig.2D). All together, these data suggest that chronic free choice ethanol intake produces an antidepressant-like effect which was not the consequence of an increase in locomotor activity, and modified neither the anxiety like profile nor the motor coordination of C57BL/6J mice.

Effects of chronic and voluntary ethanol intake on hippocampal long-term potentiation

In order to determine the synaptic plasticity status of the C57BL/6J mice after chronic and free choice ethanol consumption, we performed long-term potentiation (LTP) experiments in CA1 on hippocampal slices from “water” and “ethanol” mice. LTP was induced by theta-burst stimulus (TB5) on the Schaffer collateral and responses were recorded in the stratum radiatum in the dendritic region of CA1 (Fig. 3A). The synaptic LTP induced by TB5 was followed during 1 hour in hippocampal slices from “water” and “ethanol” mice (Fig. 3B). A second theta burst stimulus (TB10) was given to produce a near-maximal increase in synaptic responses (Fig. 3B). In “water” and “ethanol” groups, TB5 stimulation induced synaptic LTP as shown by the increase in fEPSP slope that persisted for 1 hour (Fig. 3B). Mean of fEPSP slope was not changed after TB5 in “ethanol” mice compared to “water” mice ($p = 0.4879$, Mann-Whitney test, Fig. 3C-D). However, synaptic responses after the TB10 stimulation seemed to be slightly diminished in “ethanol” mice but the statistical analysis showed no differences between groups ($p = 0.4454$, Mann-Whitney test, Fig. 3D).

Recognition memory and contextual memory after chronic ethanol consumption

In order to determine the effects of the chronic and free choice ethanol intake on mouse memory, a Novel Object Recognition task (NOR) was performed at the end of the 21 day free-choice ethanol session. A two-way ANOVA of time spent exploring objects during the acquisition and the testing sessions (1 hour and 24 hours after the training) showed a effect of ethanol ($F_{(1,22)} = 5.292$, $p < 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA), an effect of time ($F_{(2,22)} = 5.069$, $p < 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA) and no interaction between these two variables ($F_{(2,22)} = 0.489$, $p > 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA) (Fig.4A). “Ethanol” mice spent more time to explore the objects compared to “water” mice and the exploration time gradually decreased with the sessions. When analyzing the object discrimination index, no modification was observed at 1 hour ($t_{(3,22)} = 0.374$, $p > 0.05$, Bonferroni’s Multiple Comparison test, Fig.4B) and a slight but significant decreased was observed at 24 hours in “ethanol” compared to “water” mice ($t_{(3,22)} = 2.728$, $p < 0.05$, Bonferroni’s Multiple Comparison test, Fig.4B). The effect of ethanol on cued and contextual fear conditioning was analyzed at the end of a 21 day of the free choice ethanol consumption session. During the conditioning phase, a two-way ANOVA revealed a significant effect of ethanol on freezing ($F_{(1,60)} = 5.045$, $p = 0.044$, repeated measures, two-way ANOVA), an effect of time ($F_{(5,60)} = 40.060$, $p < 0.0001$, repeated measures, two-way ANOVA) and no interaction ($F_{(5,60)} = 0.602$, $p > 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA) (Fig.4C). In the contextual fear conditioning test, “ethanol” mice displayed a lower amount of freezing than “water” mice ($p = 0.031$, Student’s t test, Fig.4D left). However, during the tone test for the cued fear conditioning, the same amount of total freezing was recorded in “ethanol”

and “water” mice ($p = 0.956$, Student’s t test, Fig.4D right). These data suggest that only the hippocampus-dependent contextual fear conditioning was affected by ethanol consumption.

DISCUSSION

These present data evidenced that in C57BL/6J mice, a chronic free choice ethanol consumption induced deficits in learning and memory performances in the novel object recognition test and in fear conditioning paradigm. However, these ethanol-induced cognitive modifications were not associated to LTP alteration in CA1. At cellular level, ethanol downregulated *Bdnf* gene DNA methylation within the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus, and this effect was associated with the activation of intracellular BDNF signaling pathway. All together, these data evidenced that the increase in ethanol-induced hippocampal neuroplasticity recently reported (Stragier *et al.*, 2014) induced the activation of BDNF intracellular signaling, without enhancing cognitive performances.

Chronic ethanol exposure has been shown to deteriorate cognitive functions. In accordance with studies showing that ethanol exposure impaired memory acquisition and performances (Matthews and Morrow, 2000; Farr *et al.*, 2005), our data evidenced that a chronic free choice ethanol consumption in C57BL/6J alters the acquisition process of fear in the fear conditioning test. Indeed, mice having been exposed to ethanol spent less time in freezing behavior during the acquisition phase in the fear conditioning paradigm. In order to decipher whether this deficit in fear acquisition was related to alteration in either hippocampus- or amygdala-dependent memory, fear extinction was analyzed in contextual and cued fear memory. Interestingly, freezing in “ethanol” mice was decreased in the contextual fear test compared to “water” mice, but not modification of fear

extinction could be detected in the cued fear test. These results which demonstrated hippocampal-related memory impairments, are in accordance, at least in part, with other data showing that after ethanol injection, C57BL/6J displayed impairment in contextual and cued fear conditioning (Gould, 2003, Lattal *et al.*, 2007). A study using acute ethanol injection in rats also showed that ethanol differentially altered contextual and cued fear conditioning, depending of the dose injected. Whereas a low dose of ethanol impaired contextual fear, a high dose deteriorated both contextual and cued fear conditioning (Melia *et al.*, 1996). All these data converged to the fact that low ethanol injection or consumption impaired hippocampal related memory.

Conversely, in the NOR test, the exploration behavior of “ethanol” mice was significantly higher compared to “water” mice, whatever the sessions, training or tests performed after a 1 and a 24 hour delay. These data do not corroborate those previously reported which showed a decrease in the time spent to explore the objects during the training phase and the new object during the testing phase after injection of a high dose of ethanol in C57BL/6J mice (Ryabinin *et al.*, 2002). This last study suggested that ethanol interfered with encoding processes. Interestingly, our data infer that, although ethanol intake leads to an increase in exploration, “ethanol” mice memory performances were not altered in a short-term (1 hour) paradigm, but were impaired after 24 hours. The increase in exploration time could not be explained by locomotor activity or anxiety modifications (as shown in our results Fig.2). However, it can be hypothesized that ethanol-drinking mice could be distracted during the encoding process and that they need much time for object discrimination during the testing sessions. In addition, the long-term memory alteration could indicate that the acquisition processes were less effective in “ethanol” compared to “water” mice.

The LTP is considered as a cellular model correlated with learning and memory processes (Martin *et al.*, 2000; Chen and Tonegawa, 1997) since the synaptic activity in the Schaffer collateral/commissural pathway is involved in these processes (Gruart *et al.*, 2006). Reduction in the magnitude of LTP has been observed in the hippocampus of rats treated during 28 weeks with ethanol (Peris *et al.*, 1997). Surprisingly, although in our ethanol procedure learning and memory are strongly impaired in both the NOR test and the fear conditioning paradigm, we could not detect any significant modification when recording LTP in the mice which consumed chronic ethanol for 21 days, compared to those having only water as drinking. This paradoxical effect could emanate from the rather short (3 weeks) duration of our protocol of ethanol consumption. Indeed, LTP alterations after ethanol exposure have been shown to occur after either a long-term (28 weeks) ethanol treatment (Peris *et al.*, 1997), an intermittent ethanol vapor exposure mimicking human binge alcohol (Roberto *et al.*, 2002), or a 12 week chronic forced ethanol ingestion in liquid diet (Fujii *et al.*, 2008). These data suggest that other mechanisms than synaptic plasticity modeled by LTP are involved in the regulation of mnemonic performances after ethanol consumption, and that the observed deficits in the hippocampus of C57BL/6J mice implicate probably upstream alterations in the circuit regulating learning and memory.

Although ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior is well documented (Kliethermes, 2005), the effects of ethanol on anxiety during the period of consumption is more discussed. Several studies reported an anxiogenic effect of ethanol in alcohol-preferring rats or mice (Pandey *et al.*, 2005; Fukushiro *et al.*, 2012), but others reported no change in anxiety state during ethanol treatment (Pandey *et al.*, 2003). Under the free

choice conditions of consumption, C57BL/6J mouse anxiety was not altered by ethanol. However, “ethanol” mice displayed a decrease in immobility in the forced swim test indicated a potential antidepressant-like effect of chronic and free choice ethanol consumption which was not the consequences of changes in spontaneous locomotor activity. A similar effect has already been observed after acute ethanol administration in mice (Hirani *et al.*, 2002) and under free choice ethanol consumption in Sardinian alcohol-preferring rats (Ciccocioppo *et al.*, 1999). This antidepressant like effect was attributed to an increase in GABAergic transmission and/or a dysregulation of the serotonergic system, but can also be related to the increase in neurogenesis observed in the hippocampus of these mice (Stragier *et al.*, 2014). It is indeed well known that compounds which raise cell proliferation in the hippocampus also display antidepressant like activity in the TST or FST (Païzanis *et al.*, 2009). Besides, decrease in immobility could also be directly related to BDNF since it has been demonstrated in transgenic mice that BDNF overexpression in the hippocampus decreased the time spent in immobility in FST compared to wild type mice (Govindarajan *et al.*, 2006).

The increase in neurogenesis observed in these ethanol mice has been proposed to occur through the raise in BDNF related to epigenetic regulation (Stragier *et al.*, 2014). In order to further analyze ethanol-induced epigenetic modifications, we study the level of DNA methylation in “ethanol” mice. DNA methylation has been shown to be directly affected by the level of the S-adenosylmethionine (SAM) which is an important methyl donor group. Interestingly, ethanol has been found to impair the synthesis of SAM by inhibiting enzymes that regulates its production (Hamid *et al.*, 2009). Furthermore, chronic ethanol consumption has been shown in human to induce a global DNA

hypomethylation and altered DNMTs expression, which are responsible of the adding of methyl group at CpG sites (Manzardo *et al.*, 2012; Ponomarev *et al.*, 2012). Free choice ethanol downregulated *Dnmt3b*, which is involved in the *de novo* methylation, and reduced *Bdnf* methylation in the hippocampal Ammon's horn CA1 and CA3 but not in the DG. Ethanol intake has been reported to induce gene- and cell-specific DNA methylation modulation (Ponomarev *et al.*, 2013), suggesting that in free choice consumption, ethanol could promote the expression of BDNF by reducing *Bdnf* gene methylation through modulation of enzymes which control the synthesis of the methyl donor group and also by the inhibition of enzymes which add methyl group on CpG sites.

Whether BDNF signaling pathway could be alter by the modulation in BDNF synthesis was also addressed in the present study. Interestingly, ethanol-related anxiety and drinking behaviors have been associated to changes in the phosphorylation level of BDNF signaling pathway such as CREB, ERK and AKT (Pandey *et al.*, 2003, 2005; Misra and Pandey, 2003; Sanna *et al.*, 2002; Neasta *et al.*, 2011; Jeanblanc *et al.*, 2013). However, these signaling pathways have also been shown to be involved in the regulation of hippocampal plasticity, neurogenesis and to be stimulated by BDNF (Russo *et al.*, 2009; Lee and Son, 2009). Our data demonstrated that chronic ethanol consumption enhanced P-CREB/CREB, P-ERK/ERK and P-AKT/AKT ratios, in accordance with the increase expression of BDNF reported in our previous study (Stragier *et al.*, 2014). We reported here that ethanol consumption stimulated ERK signaling pathway, leading to an increase in CREB activation probably allowing BDNF gene transcription. Interestingly, AKT signaling is known to be involved in cell survival process through the stimulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 which is also

increase by free choice ethanol in these mice (Stragier *et al.*, 2014) probably through the positive action of NMDA, as proposed by Bhavé *et al.*, (1999). Conversely, these results are in sharp contrast to those reporting an inhibitory effect of chronic or acute ethanol exposure on the phosphorylation of these proteins (Soares-Simi *et al.*, 2013; Chandler and Sutton, 2005; Sanna *et al.*, 2002; Subbanna *et al.*, 2013). The apparent contradiction is probably related to the ethanol concentration which is offered to the mice. These studies used a forced high ethanol exposure, leading to 200 mg% of blood alcohol level, while we exposed mice to a free choice ethanol paradigm which leads to an blood alcohol level of 50 mg% only.

Ethanol-induced stimulation of the BDNF signaling pathways seems to be allowed by the increase in BDNF protein expression observed in the hippocampus of ethanol-drinking mice in our previous study (Stragier *et al.*, 2014). Interestingly, the upregulation of BDNF expression in genetically modified mice has been shown to impair working memory and induces alterations in the short-term spatial memory (Cunha *et al.*, 2009; Papaleo *et al.*, 2011). Impairments in learning and memory observed under free-choice ethanol paradigm could be, at least in part, due to the increase in BDNF expression render possible by epigenetic modifications.

In conclusion, we provide evidences that the hippocampal neurogenesis induced by ethanol was regulated by intracellular signaling pathways involving AKT, ERK and CREB. These signaling pathways are activated by TrkB receptor through the increase in BDNF expression which occurs after chromatin remodeling and DNA methylation modifications. These events, induced by the chronic and free-choice ethanol consumption, do not lead to an improvement in hippocampus-dependent learning and memory but to a deficit which

was not related to a decrease in hippocampal synaptic plasticity. It has been shown that the newborn cells in the dentate gyrus of the hippocampus are involved in cognitive flexibility (Burghardt *et al.*, 2012; Garthe *et al.*, 2009). The role of hippocampal neurogenesis after chronic and voluntary ethanol consumption in the regulation of the cognitive flexibility is a question to be addressed in future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), MILDT (APE07005DSA), IREB (2010/10 and 2011/15) and ANR (2011-BSV-017-01). E. Stragier was recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) during performance of this work.

REFERENCES

- Alijan-pour J, Abrari K, Bluki TL, Ghorbanian MT, Goudarzi I, Salmani ME, Mirshekar M (2012) Acute ethanol administration affects memory reactivation: a look at the neuronal density and apoptosis in the rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 102:321-328.
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (1993) Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112:503-510.
- Bhave SV, Ghoda L, Hoffman PL (1999) Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19:3277-3286.
- Bonsch D, Lenz B, Fiszer R, Frieling H, Kornhuber J, Bleich S (2006) Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 113:1299-1304.
- Bonsch D, Lenz B, Kornhuber J, Bleich S (2005) DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *Neuroreport* 16:167-170.
- Bonsch D, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber J, Bleich S (2004) Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm* 111:1611-1616.
- Bowden SC, McCarter RJ (1993) Spatial memory in alcohol-dependent subjects: using a push-button maze to test the principle of equiavailability. *Brain Cogn* 22:51-62.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus* 22:1795-1808.
- Chandler LJ, Sutton G (2005) Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res* 29:672-682.
- Chen C, Tonegawa S (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 20:157-184.
- Ciccocioppo R, Panocka I, Frolidi R, Colombo G, Gessa GL, Massi M (1999) Antidepressant-like effect of ethanol revealed in the forced swimming test in Sardinian alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)* 144:151-157.
- Crabbe JC, Metten P, Ponomarev I, Prescott CA, Wahlsten D (2006) Effects of genetic and procedural variation on measurement of alcohol sensitivity in mouse inbred strains. *Behav Genet* 36:536-552.
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis* 33:358-368.
- Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE (2005) Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 29:971-982.
- Franke H, Kittner H, Berger P, Wirkner K, Schramek J (1997) The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol* 14:445-454.
- Franklin KB, and Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego, California, USA, 1997.
- Fujii S, Yamazaki Y, Sugihara T, Wakabayashi I (2008) Acute and chronic ethanol exposure differentially affect induction of hippocampal LTP. *Brain Res* 1211:13-21.
- Fukushiro DF, Josino FS, Saito LP, Berro LF, Morgado F, Frussa-Filho R (2012) Acute and chronic ethanol differentially modify the emotional significance of a novel environment: implications for addiction. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:1109-1120.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4:e5464.

- Gould TJ (2003) Ethanol disrupts fear conditioning in C57BL/6 mice. *J Psychopharmacol* 17:77-81.
- Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, Chattarji S (2006) Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13208-13213.
- Gruart A, Munoz MD, Delgado-Garcia JM (2006) Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci* 26:1077-1087.
- Hamid A, Wani NA, Kaur J (2009) New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption--association with epigenome stability and cancer development. *FEBS J* 276:2175-2191.
- Hirani K, Khisti RT, Chopde CT (2002) Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one. *Neuropharmacology* 43:1339-1350.
- Jeanblanc J, Coune F, Botia B, Naassila M (2013) Brain-derived neurotrophic factor mediates the suppression of alcohol self-administration by memantine. *Addict Biol*.
- Karpova NN (2013) Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C:709-718.
- Kelai S, Renoir T, Chouchana L, Saurini F, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2008) Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 107:1660-1670.
- Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28:837-850.
- Lattal KM (2007) Effects of ethanol on encoding, consolidation, and expression of extinction following contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 121:1280-1292.
- Lee E, Son H (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42:239-244.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28:10576-10586.
- Manzardo AM, Henkhaus RS, Butler MG (2012) Global DNA promoter methylation in frontal cortex of alcoholics and controls. *Gene* 498:5-12.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711.
- Matthews DB, Morrow AL (2000) Effects of acute and chronic ethanol exposure on spatial cognitive processing and hippocampal function in the rat. *Hippocampus* 10:122-130.
- Melia KR, Ryabinin AE, Corodimas KP, Wilson MC, Ledoux JE (1996) Hippocampal-dependent learning and experience-dependent activation of the hippocampus are preferentially disrupted by ethanol. *Neuroscience* 74:313-322.
- Melis F, Stancampiano R, Imperato A, Carta G, Fadda F (1996) Chronic ethanol consumption in rats: correlation between memory performance and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Neuroscience* 74:155-159.
- Misra K, Pandey SC (2003) Differences in basal levels of CREB and NPY in nucleus accumbens regions between C57BL/6 and DBA/2 mice differing in inborn alcohol drinking behavior. *J Neurosci Res* 74:967-975.
- Mlinar B, Mascalchi S, Morini R, Giachi F, Corradetti R (2006) 5-HT4 receptor activation induces long-lasting EPSP-spike potentiation in CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24:719-731.
- Mlinar B, Mascalchi S, Morini R, Giachi F, Corradetti R (2008) MDMA induces EPSP-Spike potentiation in rat ventral hippocampus in vitro via serotonin and noradrenaline release and coactivation of 5-HT4 and beta1 receptors. *Neuropsychopharmacology* 33:1464-1475.
- Molet J, Bouaziz E, Hamon M, Lanfumey L (2012) Early exposure to ethanol differentially affects ethanol preference at adult age in two inbred mouse strains. *Neuropharmacology* 63:338-348.
- Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (2010) Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67:73-88.
- Neasta J, Ben Hamida S, Yowell QV, Carnicella S, Ron D (2011) AKT signaling pathway in the nucleus accumbens mediates excessive alcohol drinking behaviors. *Biol Psychiatry* 70:575-582.
- Nuutinen S, Kiianmaa K, Panula P (2011) DARPP-32 and Akt regulation in ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Neurosci Lett* 503:31-36.
- Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, Melfort M, Gabriel C, Barden N, Mocaer E, Hamon M, Lanfumey L (2009) Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:759-774.
- Pandey SC, Roy A, Mittal N (2001) Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the creb gene transcription factor in rat cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 296:857-868.
- Pandey SC, Roy A, Zhang H (2003) The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 27:396-409.
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T (2005) Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding

- protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest* 115:2762-2773.
- Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN (2011) Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* 18:534-544.
- Peris J, Anderson KJ, Vickroy TW, King MA, Hunter BE, Walker DW (1997) Neurochemical basis of disruption of hippocampal long term potentiation by chronic alcohol exposure. *Front Biosci* 2:d309-316.
- Ponomarev I (2013) Epigenetic control of gene expression in the alcoholic brain. *Alcohol Res* 35:69-76.
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32:1884-1897.
- Roberto M, Nelson TE, Ur CL, Gruol DL (2002) Long-term potentiation in the rat hippocampus is reversibly depressed by chronic intermittent ethanol exposure. *J Neurophysiol* 87:2385-2397.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12:623-637.
- Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:73-82.
- Ryabinin AE (1998) Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology (Berl)* 139:34-43.
- Ryabinin AE, Miller MN, Durrant S (2002) Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 71:307-312.
- Sanna PP, Simpson C, Lutfens R, Koob G (2002) ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res* 948:186-191.
- Soares-Simi SL, Pastrello DM, Ferreira ZS, Yonamine M, Marcourakis T, Scavone C, Camarini R (2013) Changes in CREB activation in the prefrontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. *Front Integr Neurosci* 7:94.
- Stragier E, Massart R, Sallery M, Hamon M, Geny D, Martin V, Boule F, Lanfumey L (2014) Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Mol Psychiatry*.
- Stuchlik A (2014) Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci* 8:106.
- Subbanna S, Shivakumar M, Psychoyos D, Xie S, Basavarajappa BS (2013) Anandamide-CB1 receptor signaling contributes to postnatal ethanol-induced neonatal neurodegeneration, adult synaptic, and memory deficits. *J Neurosci* 33:6350-6366.
- Tordoff MG, Bachmanov AA (2003) Influence of the number of alcohol and water bottles on murine alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 27:600-606.
- Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S, Ron D (2013) Chromatin remodeling--a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Transl Psychiatry* 3:e231.
- Wayner MJ, Chitwood R, Armstrong DL, Phelix C (1997) Ethanol affects hypothalamic neurons projecting to the hippocampus and inhibits dentate granule cell LTP. *Alcohol* 14:1-7.
- Yang X, Horn K, Baraban JM, Wand GS (1998a) Chronic ethanol administration decreases phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in granule cells of rat cerebellum. *J Neurochem* 70:224-232.
- Yang X, Horn K, Wand GS (1998b) Chronic ethanol exposure impairs phosphorylation of CREB and CRE-binding activity in rat striatum. *Alcohol Clin Exp Res* 22:382-390.
- Zhang R, Miao Q, Wang C, Zhao R, Li W, Haile CN, Hao W, Zhang XY (2013) Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol* 18:392-403.

TABLES

Gene	Water	Ethanol	Percent over Water	P value
<i>Dnmt1</i>	1.014 ± 0.090 (5)	0.918 ± 0.050 (9)	-9.47	ns
<i>Dnmt3a</i>	1.005 ± 0.042 (6)	1.167 ± 0.059 (9)	+16.12	ns
<i>Dnmt3b</i>	1.018 ± 0.087 (6)	0.795 ± 0.043 (9)	-21.91	*

Table 1: Effects of chronic ethanol intake on hippocampal levels of mRNAs encoding DNA methyltransferases.

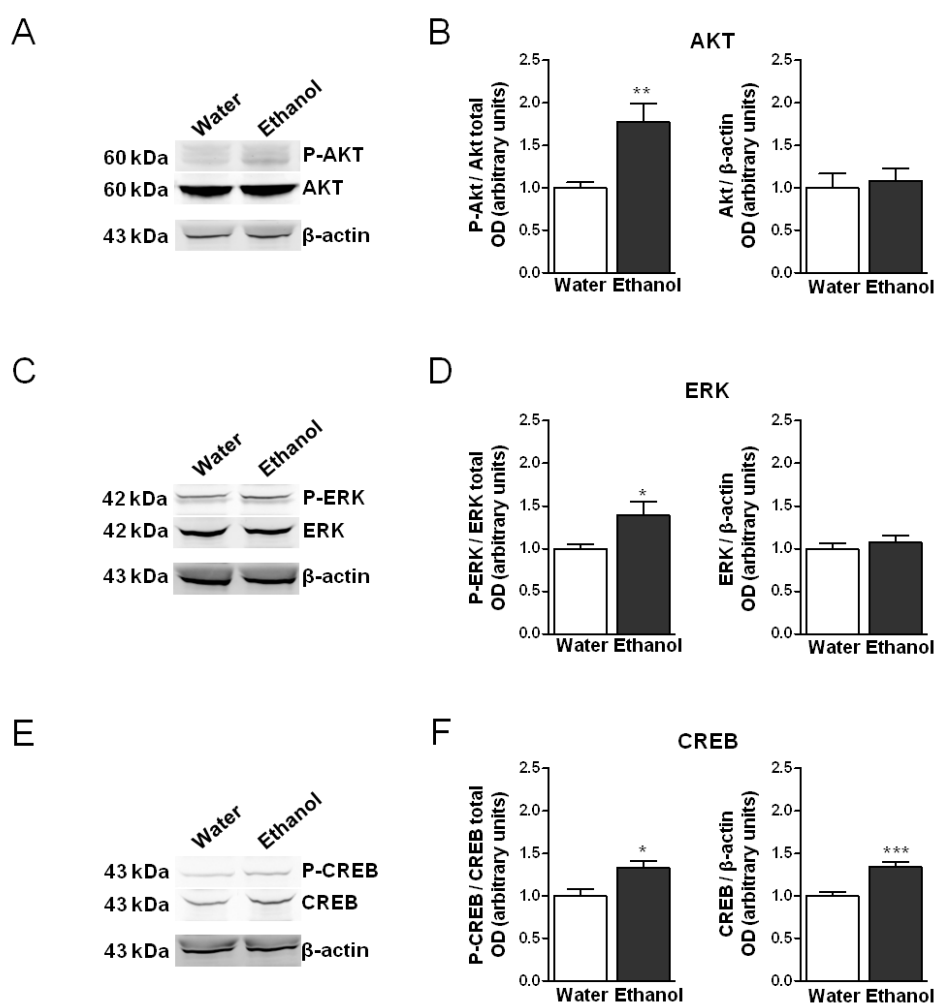
mRNA levels were measured by real-time RT-qPCR in the hippocampus of “water” and “ethanol” mice. Results [mean ± S.E.M. of (n) mice] are expressed as arbitrary units after normalization to the endogenous reference genes encoding *Hprt* and *β-actin*. * p < 0.05, significantly different in “ethanol” versus “water” mice, ns: not significant, one way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison test.

Dentate gyrus			
<i>Bdnf</i> CpG Islands	Water	Ethanol	Dunn's t test
I	1.000 ± 0.006 (6)	1.006 ± 0.010 (8)	ns
II	1.000 ± 0.009 (6)	1.001 ± 0.007 (8)	ns
III	1.000 ± 0.012 (6)	0.987 ± 0.006 (8)	ns
IV	1.000 ± 0.010 (6)	1.006 ± 0.005 (8)	ns
V	1.000 ± 0.010 (6)	1.004 ± 0.007 (8)	ns
VI	1.000 ± 0.009 (6)	1.002 ± 0.006 (8)	ns
VII	1.000 ± 0.008 (6)	1.014 ± 0.003 (8)	ns
<i>Gapdh</i>	1.000 ± 0.008 (6)	1.011 ± 0.006 (8)	ns
CA1			
<i>Bdnf</i> CpG Islands	Water	Ethanol ^{\$\$\$\$}	Dunn's t test
I	1.000 ± 0.013 (5)	0.976 ± 0.006 (8)	ns
II	1.000 ± 0.014 (5)	0.969 ± 0.006 (8)	ns
III	1.000 ± 0.014 (5)	0.977 ± 0.004 (8)	ns
IV	1.000 ± 0.012 (5)	0.974 ± 0.009 (8)	ns
V	1.000 ± 0.013 (5)	0.956 ± 0.008 (8)	*
VI	1.000 ± 0.009 (5)	0.985 ± 0.008 (8)	ns
VII	1.000 ± 0.015 (5)	0.985 ± 0.014 (8)	ns
<i>Gapdh</i>	1.000 ± 0.014 (5)	0.991 ± 0.011 (8)	ns
CA3			
<i>Bdnf</i> CpG Islands	Water	Ethanol ^{\$}	Dunn's t test
I	1.000 ± 0.009 (6)	0.991 ± 0.008 (8)	ns
II	1.000 ± 0.010 (6)	0.985 ± 0.008 (8)	ns
III	1.000 ± 0.005 (6)	0.997 ± 0.009 (8)	ns
IV	1.000 ± 0.005 (6)	0.998 ± 0.007 (8)	ns
V	1.000 ± 0.007 (6)	0.988 ± 0.008 (8)	ns
VI	1.000 ± 0.010 (6)	0.984 ± 0.008 (8)	ns
VII	1.000 ± 0.006 (6)	0.982 ± 0.008 (8)	ns
<i>Gapdh</i>	1.000 ± 0.006 (6)	0.997 ± 0.007 (8)	ns

Table 2: Effects of chronic ethanol intake on the *Bdnf* gene methylation in the dentate gyrus, CA1 and CA3 subfields of the hippocampus.

Methylation enrichment levels on the different *Bdnf* CpG islands were measured by real-time qPCR of the immunoprecipitated DNA with a specific antibody against 5-methylcytidine in the three subfields of hippocampus of “water” and “ethanol” mice. Results [mean ± S.E.M. of (n) mice] are expressed as arbitrary units after normalization of the ratio immunoprecipitated DNA / Input DNA to the control group of “water” mice for each CpG island. A two-way ANOVA analysis showed an ethanol effect on the methylation of *Bdnf* CpG islands in CA1 and CA3 subfields of the hippocampus; ^{\$} p < 0.05, ^{\$\$\$\$} p < 0.0001. *p < 0.05, significantly different in “ethanol” versus “water” mice, ns: not significant, one way ANOVA followed by Dunn's t test.

FIGURES

**Figure 1****Effects of ethanol intake on hippocampal BDNF cellular signaling pathway**

The effects of chronic and free choice ethanol intake on BDNF signaling pathway were measured by immunoblotting at the level of AKT and phospho- (P-) AKT (A), ERK and P-ERK (C) and CREB and P-CREB (E). The level of phosphorylation was expressed on the total level of proteins and protein expression was normalized by β-actin.

Quantifications of the western blots showed that P-AKT (B, left), P-ERK (D, left) and P-CREB (F, left) were increased in “ethanol” compared to “water” mice. Whereas AKT (B, right) and ERK (D, right) protein expressions were not influenced by ethanol consumption, that of CREB protein (F, right) was stimulated in “ethanol” compared to “water” mice. Each bar is the mean ± S.E.M. of n = 6 (“water”) and n = 9 (“ethanol”) mice; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Unpaired t test with Welch’s correction.

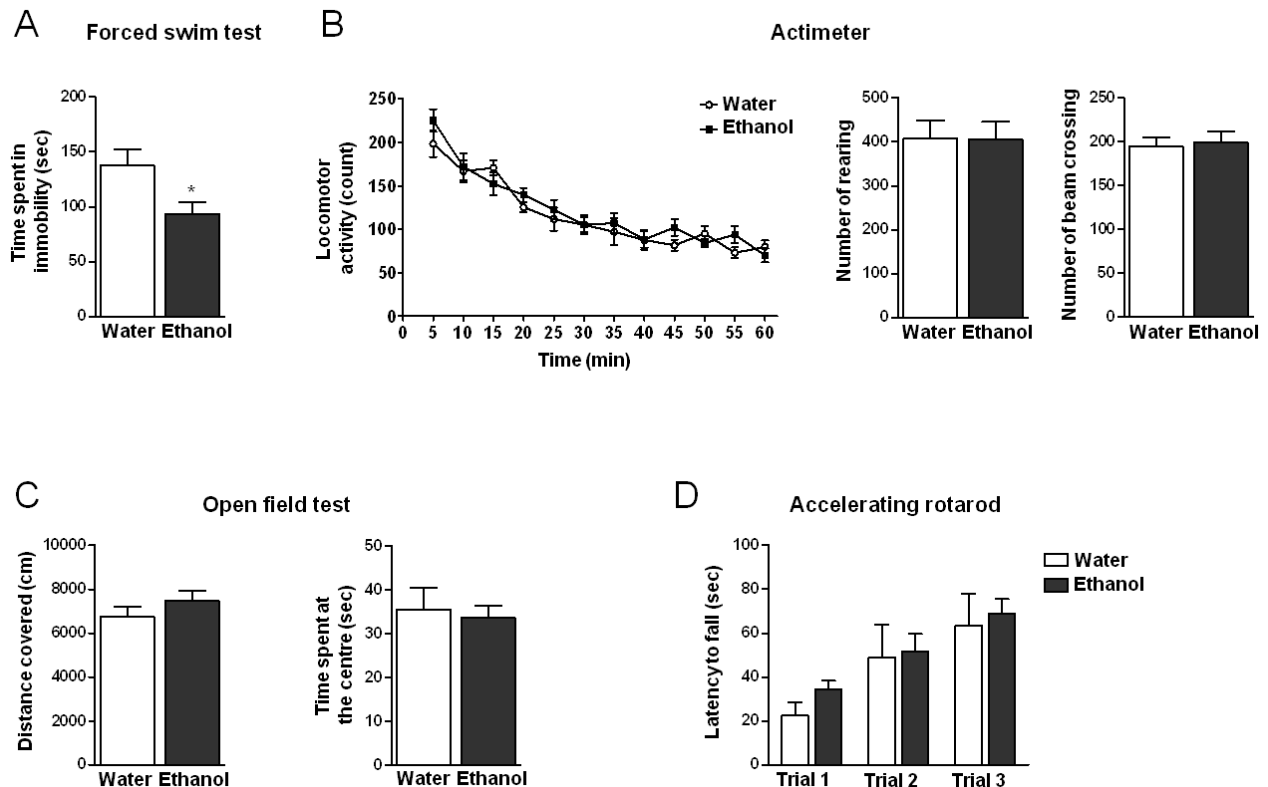


Figure 2

Anxiety and depression-like behaviors in “water” and “ethanol” mice

(A) Mice were submitted to the forced swim test during 6 min and the immobility time was recorded. A decrease in the time spent in immobility was observed in “ethanol” mice compare to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 8$ (“water”) and $n = 10$ (“ethanol”) mice; * $p < 0.05$, Student’s t test

(B) Mice were placed in actimetry boxes and the total locomotor activity during a 1 hour period was measured. “Ethanol” mice differed neither in their locomotor activity, nor in the numbers of rearing and beam crossing relative to “water” mice. Each point is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 6$ (“water”) and $n = 9$ (“ethanol”) mice.

(C) Mice were subjected to an open field test and the distance covered, the times spent at the periphery and at the centre were recorded over a 15 minute period. No differences were measured in “ethanol” mice compared to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 8$ (“water”) and $n = 10$ (“ethanol”) mice.

(D) Mice were placed on an accelerating rotarod, and the latency to fall was measured. Ethanol consumption did not affect the motor coordination in the three consecutive trials of 5 min with an inter-trial interval of 5 min. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 8$ (“water”) and $n = 10$ (“ethanol”) mice.

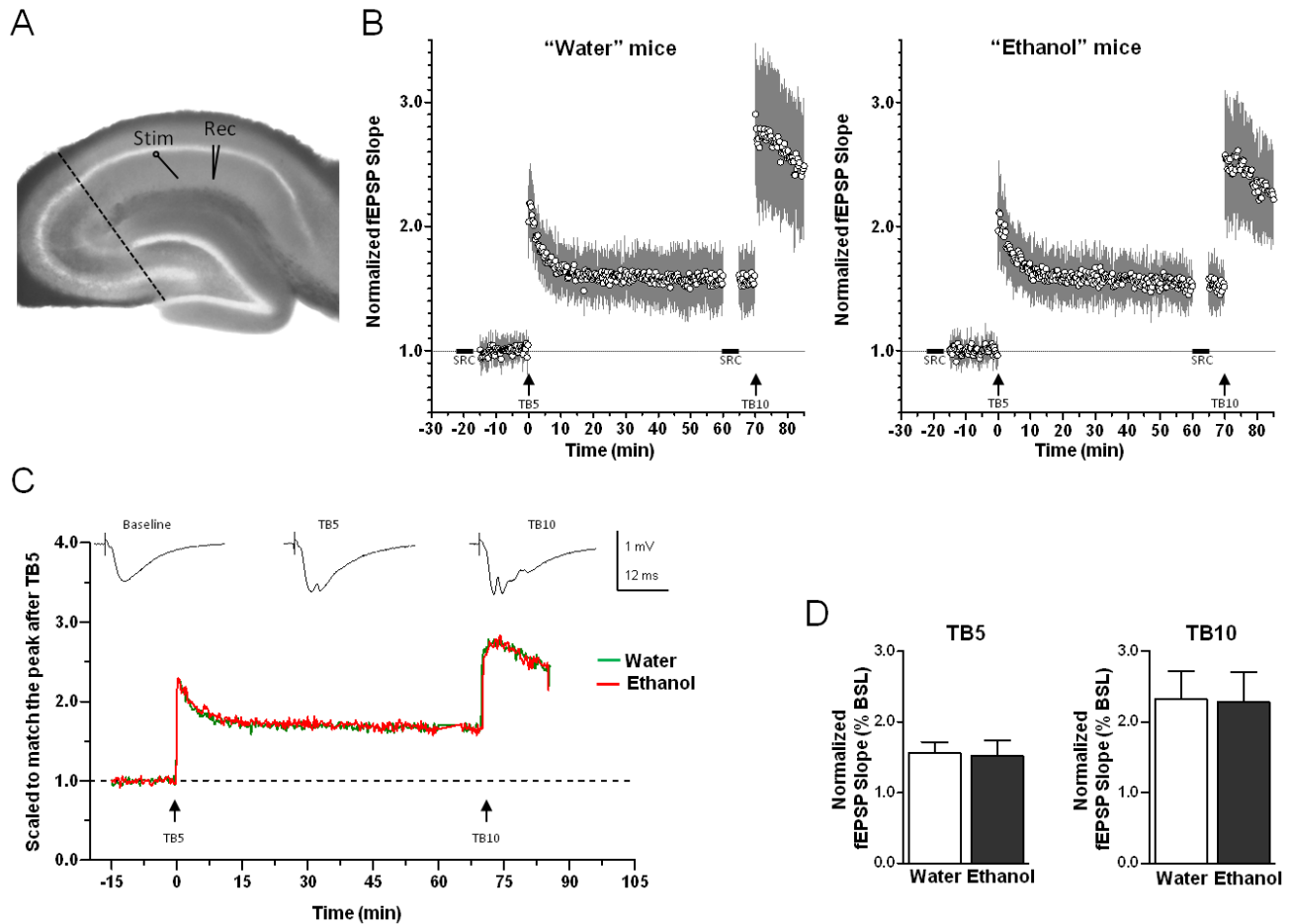


Figure 3

Effects of ethanol intake on long-term potentiation in the hippocampus

(A) Photomicrograph showing the placement of the stimulating and recording electrodes on a mouse hippocampal slice. Stimulating electrode (Stim) was placed in the *stratum radiatum* 400 μ m apart from the recording electrode (Rec) located in the dentritic region of CA1 pyramidal cells. Dotted line indicates position of a cut made to separate CA1 and CA3 regions.

(B) Time-course of changes in field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) slope induced by TB5 and TB10 stimuli in "water" mice (left, n = 19) and "ethanol" mice (right, n = 15). After a collection of a stimulus response curve (SRC, black square), baseline responses were recorded for 15 min. TB5 and TB10 stimuli were delivered at time points indicated by arrows. TB5-induced LTP was followed for 1 hour and a second SRC was then collected. 5 min after the second SRC, TB10 was delivered and followed for 15 min.

(C) To show the similarity in the time-courses of LTP after TB5 and TB10 stimulation in slices from "ethanol" mice compared with "water" mice, the mean values of the time-courses shown in (B) have been scaled to match the peak response immediately after TB5 and superimposed. Upper traces illustrate the changes in fEPSP responses following TB5 and TB10 stimulation in a typical experiment.

(D) Comparison of the fEPSP slope after TB5 (left) and TB10 (right) showed no changes between "water" and "ethanol" mice. Each bar is the mean $\pm$ SD of n = 19 ("water") and n = 15 ("ethanol") slices.

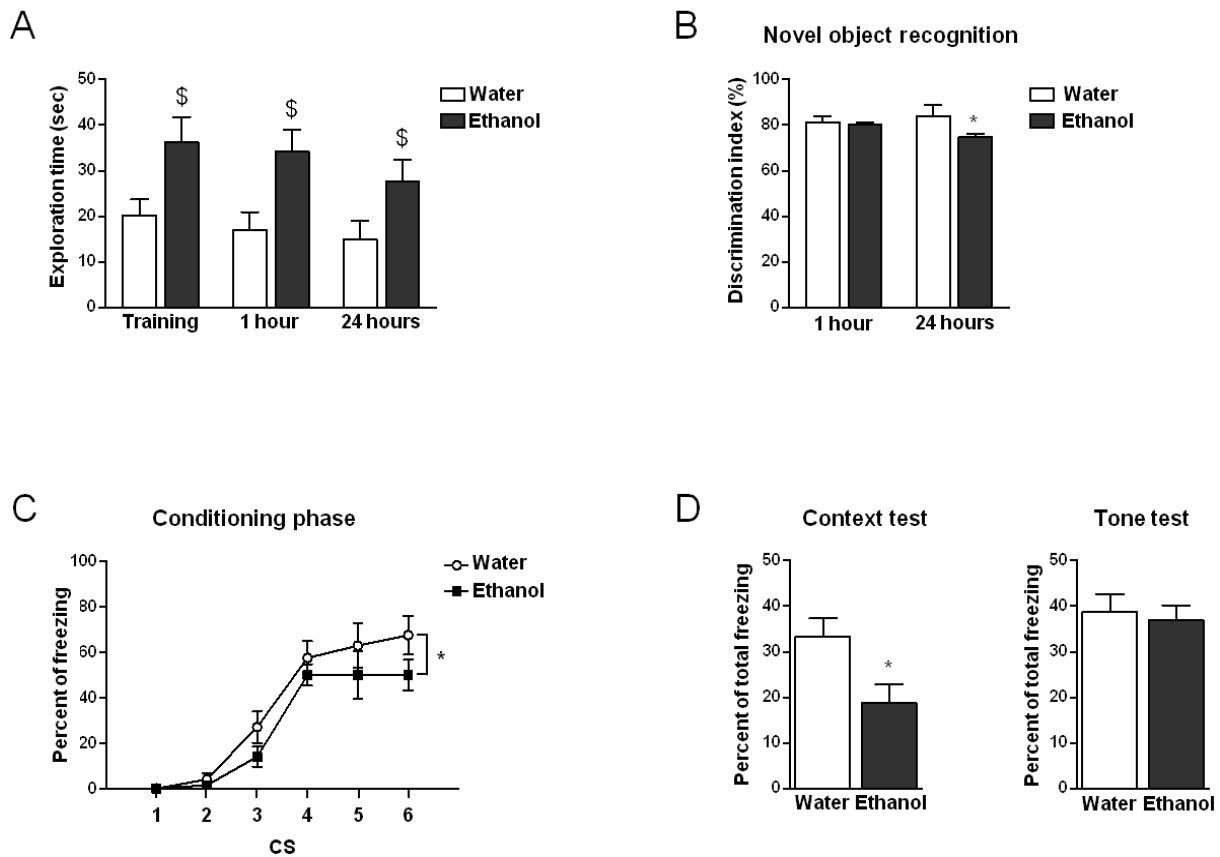


Figure 4

Effects of ethanol intake on the object recognition task and in contextual memory

(A and B) Episodic-like memory was evaluated in the novel object recognition test. Time spent exploring the objects was quantified during the acquisition and within the testing sessions 1h and 24 h.

(A) “Ethanol” mice spent significantly more time in exploration compared to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 5$ (“water”) and $n = 8$ (“ethanol”) mice; $^{\$} p < 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA.

(B) Mice recognition performances are represented as the discrimination index. No difference in the object recognition was observed at 1 hour of retention whereas a decrease in the discrimination index was evidenced at 24 hours after the acquisition session in “ethanol” mice relative to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 5$ (“water”) and $n = 8$ (“ethanol”) mice; $^* p < 0.05$, Bonferroni’s multiple comparison test.

(C) Chronic and voluntary ethanol consumption induces a significant decrease in percentage of freezing during the conditioning phase of the fear conditioning test for the 6 conditioning stimulus (CS) given to “water” and “ethanol” mice. Each point is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 6$ (“water”) and $n = 9$ (“ethanol”) mice; $^* p < 0.05$, repeated measures, two-way ANOVA.

(D) Compared to “water” mice, “ethanol” mice showed a decrease in total time spent in freezing during the extinction context of fear conditioning whereas no difference was noted for the tone test extinction. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M. of $n = 6$ (“water”) and $n = 9$ (“ethanol”) mice; $^* p < 0.05$, Student’s t test.

Supplementary information

Supplementary tables

Experiments	Ethanol consumption (g/kg/day) during stabilization period with 10% ethanol in drinking water	Total fluid consumed (g/kg/day)	Number of mice
Behavioral testing (OF, Rotarod, FST)	11.90 ± 0.97	182.10 ± 18.24	Water n=8 Ethanol n=10
Behavioral testing (actimeter)	11.50 ± 0.34	170.20 ± 15.66	Water n=6 Ethanol n=9
Behavioral testing (Novel object recognition)	10.60 ± 0.53	135.30 ± 10.25	Water n=6 Ethanol n=9
Behavioral testing (Fear conditioning)	10.46 ± 0.36	142.70 ± 13.12	Water n=6 Ethanol n=8
RT-qPCR	9.17 ± 0.62	140.00 ± 17.84	Water n=6 Ethanol n=9
Immunoblotting	9.54 ± 0.88	139.50 ± 17.70	Water n=6 Ethanol n=9
MeDIP	11.83 ± 0.43	153.90 ± 14.51	Water n=6 Ethanol n=9
LTP recordings	9.23 ± 0.20	129.40 ± 2.14	Water n=15 Ethanol n=13

Table S1: Ethanol intake and total fluid consumed within the different groups of mice having free access to 10% ethanol that had been included in the various experimental series.

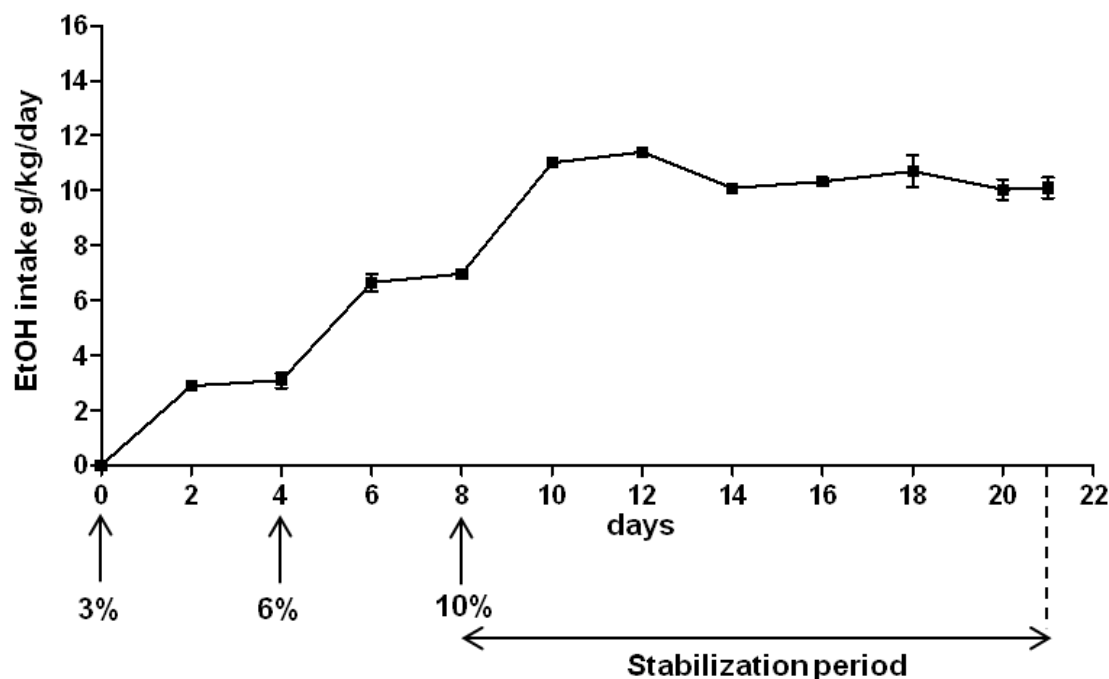
mRNA expression analysis		
Genes	5' primer	3' primer
<i>Dnmt1</i>	AGCCGCTCAAAGCAAAAGTG	TGGGGTTCATCCACAGCATC
<i>Dnmt3a</i>	TCAATGTCACCCTGGAGCAC	CTGCAGCAGTTGTTGTTCCC
<i>Dnmt3b</i>	GATGAGGAGAGCCGAGAACG	CAGAGCCCACCCTCAAAGAG
<i>Hprt</i>	GATGATGAACCAGGTTATGAC	GTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG
<i>β-actin</i>	CCACCATGTACCCAGGCATT	CGGACTCATCGTACTCCTGC

Table S2: Primer sequences used for quantitative real-time PCR analysis of mRNAs with SYBR Green technology.

Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) analysis		
<i>Bdnf</i> CpG islands	5' primer	3' primer
<i>I</i>	CGCAGTCACTAGTGGGAAGTGTA	GTGTAGGCTAGGAGGGAAGAT
<i>II</i>	AACGTAAGGAAGTGGAAGAAACC	ATGAAGTACTACCACCTCGGACA
<i>III</i>	GGAAGGTCCTTTCTAGATCGAAG	TACCAGGCCACCCAGGTAGT
<i>IV</i>	CGTTTTCTCAGTCAGATCTACGC	TCCGTATTTAAAACAGCACCATC
<i>V</i>	CTATTTTCGAGGCAGAGGAGGTAT	GAGAAGCTCCATTTGATCTAAGGC
<i>VI</i>	CTAGGGGACTGAGAAGTTGTGG	TTTCTCTCACACTGAAGGGATTC
<i>VII</i>	TTGGAGCCTCCTCTACTCTTTCT	AGACATGTCCACTGCAGTCTTTT
<i>Gapdh</i>	CTCCCAGGAAGACCCTGCTT	GGAACAGGGAGGAGCAGAGA

Table S3: Primer sequences used for MeDIP analysis. The CpG island was defined as follow: island size > 200 bp, GC Percent > 50.0%, observed/expected > 0.6.

Supplementary figure

**Figure S1**

Ethanol consumption by C57BL/6J mice during the 21 day free-choice period. Mice were offered 3% v/v ethanol (EtOH) versus water for 4 days, then 6% ethanol versus water for the next 4 days, and finally animals had access to 10% ethanol versus water for the subsequent 13 days (stabilization period). Positions of the tubes filled with ethanol or water were changed every two days to avoid possible preference bias. Food (standard mouse pellets A03; UAR, Strasbourg, France) was given ad libitum. Absolute grams of ethanol intake/kg body weight/24 h were determined for each mouse. Each point is the mean $\pm$ S.E.M. of 76 independent determinations. During the stabilization period, daily ethanol quantity consumed was 10.53 ± 0.20 g/kg/day (mean $\pm$ S.E.M., $n = 76$).

Résultats supplémentaires

Résultats supplémentaires

En plus des deux précédentes études, d'autres expérimentations ont été conduites sur les souris C57BL/6J après trois semaines de consommation d'éthanol.

Nous avons mesuré l'expression des messagers des enzymes modifiant l'ADN et les histones qui s'ajoutent à celles analysées dans les deux articles.

Nous avons quantifié l'expression protéique de HDAC1 ainsi que de MeCP2, protéine impliquée dans la régulation de l'expression du BDNF et de la plasticité neuronale.

D'autres modifications post-traductionnelles des histones ont été analysées sur les promoteurs du BDNF, venant s'ajouter à celles observées dans l'article 1.

Nous nous sommes intéressés au variant d'histone H2Az, qui est impliqué dans la régulation de la prolifération.

Enfin, nous avons mesuré l'effet de la consommation chronique et libre d'éthanol sur les concentrations plasmatiques de BDNF.

Les amorces et les anticorps utilisés dans cette partie sont listés dans les tableaux A1 et A2. Les expériences de ChIP, d'ELISA et d'immunohistochimie ont été réalisées selon la section « matériels et méthodes » de l'article 1. L'analyse statistique a été effectuée selon la même méthode que celle décrite dans les deux articles.

Les résultats expérimentaux décrits précédemment faisant l'objet de publications ou de futures publications dans des journaux internationaux, cette partie concernant les résultats supplémentaires est rédigée en anglais.

MATERIALS

mRNA expression analysis		
Genes	5' primer	3' primer
<i>Gadd45b</i>	GTTCTGCTGCGACAATGACA	TTGGCTTTTCCAGGAATCTG
<i>Myst2</i>	GGTACTGCTCCGATACCTGC	TCTGAAGGGCTTGCAGAGTG
<i>Mll3</i>	TCCCGATAGTTTCGTCCCCT	AGAATGGGGATGATGGGGGA
<i>Mll4</i>	CTCGCCACTGAGGATACGTC	CCCTGTAGACCCTGTAGGCT
<i>Kdm5b</i>	GTTTGGCAGTGGCTTTCCTG	ATGCCACATACAACCAGGG
<i>Cbp</i>	CGGGCAGGGGATGAG	GCGAGCCAGCGAGGA
<i>Hprt</i>	GATGATGAACCAGGTTATGAC	GTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG
<i>β-actin</i>	CCACCATGTACCCAGGCATT	CGGACTCATCGTACTCCTGC

Table A1: Primer sequences used in quantitative real-time PCR mRNAs analysis with Absolute SYBR Green technology.

Antibodies		
Antigen	Species	Supplier – reference
HDAC1	Rabbit	Abcam – ab7028
MeCP2	Rabbit	Millipore – 07-013
P-MeCP2	Rabbit	Abcam – ab75716
H4Ac	Rabbit	Millipore – 06-866
H3K27me2	Rabbit	Abcam – ab24684
H2A.Z	Rabbit	Abcam – ab4174

Table A2: Antibodies used in immunohistochemistry experiments and ChIP analysis in the additional “Additional Results” part.

RESULTS

Expression of histone and DNA-modifying enzymes after chronic and voluntary ethanol consumption

In addition to *Hdac* expression (presented in Article 1), we analyzed that of others histone-modifying enzymes: *Myst2* (or *HBO1*), *Mll3* and 4 (*mixed lineage leukemia 3* and 4) and *Kdm5b* (*lysine-specific demethylase 5b*). *Myst2* is a part of the origin recognition complex (ORC) which initiates DNA replication and possesses an acetyltransferase activity on histone H3 and H4 (Izuka and Stillman, 1999). *Mll3* and 4 are H3K4-specific methyltransferases (Lee *et al.*, 2009) while *Kdm5b* mediates H3K4 demethylation (Yamane *et al.*, 2007). We observed a decrease in mRNA expression of *Myst2* while that of *Mll3* and 4 and *Kdm5b* was increased but without reaching the statistical significance ($t_{9,56} = 2.267$; $t_{9,56} = 2.379$; $t_{9,56} = 0.394$; $t_{9,56} = 0.0891$; respectively, $p > 0.05$, Bonferroni's multiple comparison test, Table A3).

Gene	Water	Ethanol	Percent over Water	P value
<i>Myst2</i>	1.008 ± 0.821 (5)	0.821 ± 0.025 (8)	- 19.35	ns
<i>Mll3</i>	1.001 ± 0.030 (5)	1.190 ± 0.057 (8)	+ 18.78	ns
<i>Mll4</i>	1.008 ± 0.063 (5)	1.039 ± 0.060 (8)	+ 2.28	ns
<i>Kdm5b</i>	1.008 ± 0.071 (5)	1.013 ± 0.048 (8)	+ 0.30	ns
<i>Cbp</i>	1.000 ± 0.020 (6)	1.012 ± 0.035 (9)	+ 1.20	ns
<i>Gadd45b</i>	1.006 ± 0.056 (5)	0.763 ± 0.057 (8)	- 24.76	*

Table A3. Effects of chronic ethanol intake on hippocampal levels of mRNAs encoding DNA and histone-modifying enzymes. mRNA levels were measured by real-time RT-qPCR in the hippocampus of “water” and “ethanol” mice. Results [mean ± S.E.M. of (n) mice] are expressed as arbitrary units after normalization to the endogenous reference genes encoding *Hprt* and *β-actin*. * $p < 0.05$, significantly different in “ethanol” versus “water” mice, ns: not significant, one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

Besides the *DNA methyltransferases* (*DNMTs*) analyzed in the Article 2, we analyzed the expression of *Gadd45b* (*growth arrest and DNA damage-inducible 45b*) which is also involved in the active DNA demethylation (Barreto *et al.*, 2007; Niehrs, and Schäfer, 2012) in

a gene-specific manner, notably for *Bdnf* and *Fgf-1* genes, to promote cell proliferation and dendritic development of newborn neurons (Ma *et al.*, 2009). We observed that *Gadd45b* mRNA expression was significantly decreased after chronic and voluntary ethanol intake ($t_{9,56} = 3.034$, $p < 0.05$, Bonferroni's multiple comparison test, Table A3).

Effect of ethanol intake on HDAC1 and MeCP2 protein expression in the hippocampus

We showed (Article 1) that HDACs mRNA expression was modulated after a chronic and voluntary ethanol exposure. We presented results of HDAC2 immunostaining and showed that HDAC2 protein level was decreased in the DG but unchanged in CA3 after ethanol intake. We also performed HDAC1 immunostaining in the hippocampus and observed that HDAC1 protein expression was increased in the DG ($p = 0.0428$, Student t test, Figure A1B) but not modified in CA3 ($p = 0.6437$, Student t test, Figure A1B) after chronic and free choice ethanol consumption. This result was opposite to that (decrease) observed for HDAC1 mRNA in the whole hippocampus. It is possible that specific compensatory mechanisms, such as the recycling loop, were induced in response to the HDAC1 mRNA expression decrease to keep the protein content at basal level.

We evidenced in the first study that methyl-CpG binding protein MeCP2 mRNA expression was increased after ethanol intake. When immunolabelling MeCP2 and P-MeCP2 within the hippocampus, we observed a decrease in P-MeCP2/MeCP2 ratio in both DG and CA3 ($p = 0.0358$; $p = 0.0136$; respectively, Student t test, Figure A1D). MeCP2 has been shown to bind exon 4 *Bdnf* promoter, to induce its repression, and neuronal activity has been shown to induce MeCP2 phosphorylation correlated with an increase in BDNF expression (Zouh *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011). Our results show that of P-MeCP2 amount was decreased after ethanol consumption, leading probably to a stronger binding to target genes, including that of *Bdnf* exon 4, and to gene transcription repression. It is possibly for this reason that *Bdnf* exon 4 was

not modified after chronic and voluntary ethanol consumption. Further experiments are needed to confirm that MeCP2 binding within exon 4 promoter was unchanged.

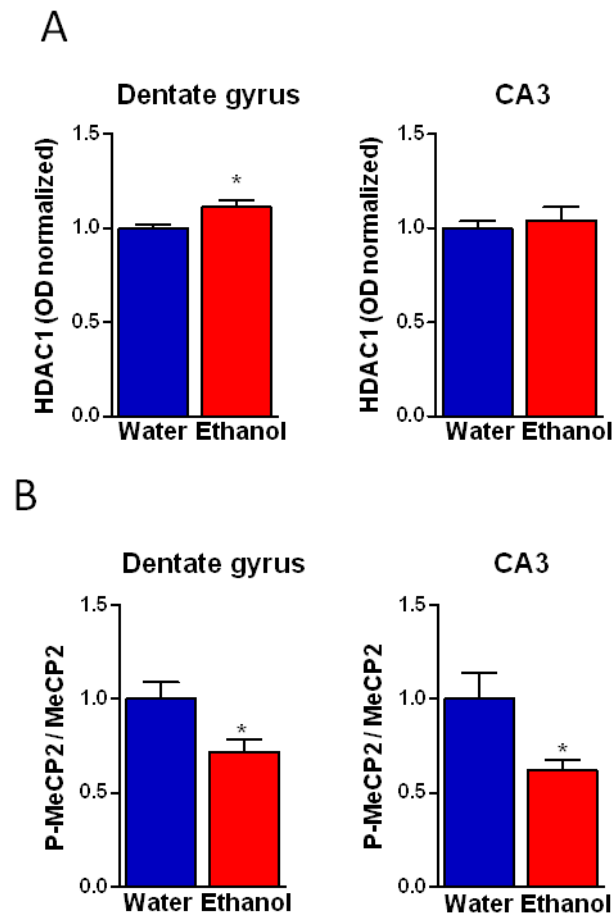


Figure A1. HDAC1 and MeCP2 protein expressions in “water” and “ethanol” mouse hippocampus. (A) Optical density (OD) quantification of HDAC1 labeling in the DG and CA3 subfields. HDAC1 OD was normalized to the “water” value. Under ethanol, HDAC 1 protein expression was increased in the DG, but not in CA3, compared to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M of $n = 5$ (water) and $n = 8$ (ethanol) mice, * $p < 0.05$, Student’s t test. (B) P-MeCP2 / MeCP2 ratio in the DG and CA3 in “water” and “ethanol” mice. Ratio of P-MeCP2 and MeCP2 OD was normalized to the “water” value. In both the DG and CA3, the ratio was decreased after chronic ethanol intake. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M of $n = 5$ (water) and $n = 8$ (ethanol) mice, * $p < 0.05$, Student’s t test.

Chromatin remodeling within *Bdnf* promoters after after chronic and voluntary ethanol intake

In the first article, we demonstrated that BDNF expression stimulation was due to an important chromatin remodeling at the level of its promoters, involving acetylated histone H3 and trimethylated histone H3 on lysine 4. We were interested in two others post-translational

histone modifications: acetylated histone H4 (H4Ac) which is involved in the chromatin relaxation allowing an active gene transcription, and dimethylated histone H3 on lysine 27 (H3K27me2) which leads to a repressive gene transcription by chromatin compaction. We analyzed the enrichment of these two modified histones within *Bdnf* promoters whose exons expression was modulated after chronic and voluntary ethanol intake. We showed before that under chronic and voluntary ethanol intake, expression of exon II, III, VI was increased while exon VIII expression was decreased. The expression of exon I and IV was not changed and we detected neither exon V nor VII.

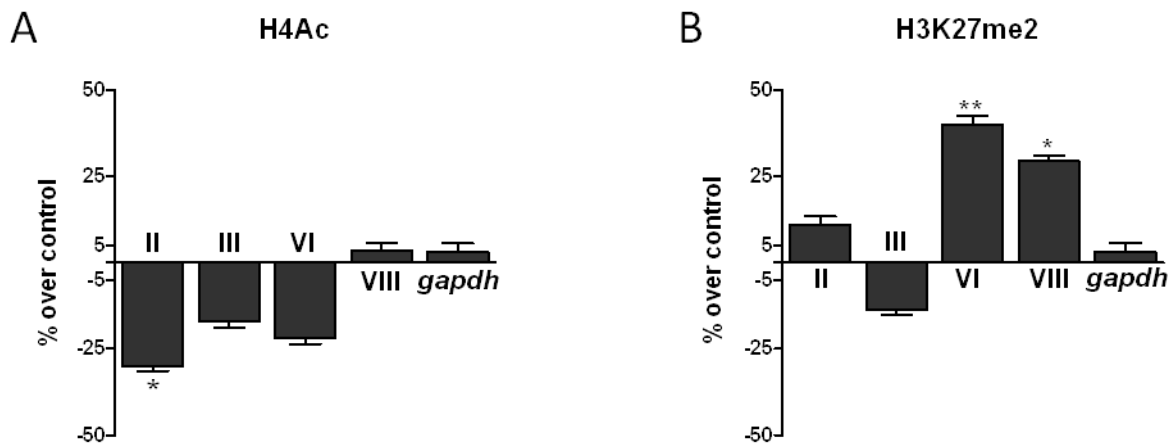


Figure A2. Post translational modification within *Bdnf* promoters in “water” and “ethanol” mouse hippocampus. (A) H4Ac expression was significantly decreased in “ethanol” versus “water” mice within PII but not modified within PIII, PVI and PVIII levels. (B) H3K27me2 expression was significantly increased within PVI and PVIII but not modified within PII and PIII levels. In both (A) and (B), quantification of immunoprecipitated DNA after PCR amplification was expressed as percent change in “ethanol” versus “water” (control) mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M of $n = 5$ (water) and $n = 9$ (ethanol) mice, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA, Bonferroni’s multiple comparison test.

Here, we observed a significant decrease in the enrichment of H4Ac within promoter II without changes in H3K27me2 ($t_{9,62} = 2.861$, $p < 0.05$; $t_{9,55} = 1.010$, $p > 0.05$; respectively, Bonferroni’s multiple comparison test, Figure A2B-D). Concerning promoter III, no modification of enrichment was evidenced for H4Ac as well as H3K27me2 ($t_{9,62} = 1.506$, $p > 0.05$; $t_{9,55} = 1.351$, $p > 0.05$; respectively, Bonferroni’s multiple comparison test, Figure A2B-D). *Bdnf* gene promoter VI was enriched in H3K27me2 without change in H4Ac level ($t_{9,55} =$

3.684, $p < 0.01$; $t_{9,62} = 2.118$, $p > 0.05$; respectively, Bonferroni's multiple comparison test, Figure A2B-D). Finally, promoter VIII was showed to be enriched in H3K27me2 without modulation of H4Ac ($t_{9,55} = 2.773$, $p < 0.05$; $t_{9,62} = 0.334$, $p > 0.05$; respectively, Bonferroni's multiple comparison test, Figure A2B-D).

A summary of all post-translational histone modifications studied at the level of *Bdnf* promoters is presented in Table A4. Concerning PII, we observed a decrease in H4Ac and an increase in H3K4me3, two marks of an active transcription. A same regulation occurs within PII, a decrease in H3Ac but an increase in H3K4me3. These results suggest a dynamic regulation of post-translational histone modifications allowing a sensitive regulation in gene transcription. It is possible that other post-translational histone modifications were also involved in the *Bdnf* exon transcription.

<i>Bdnf</i> promoters	Post-translational histone modifications			
	H4Ac	H3Ac	H3K4me3	H3K27me2
PII	↘	=	↗	=
PIII	=	↘	↗	=
PVI	=	↗	=	↗
PVIII	=	↘	↘	↗

Table A4: Summary of the effects of chronic ethanol intake on post-translational histone modifications within the *Bdnf* promoters whose mRNA exon expression was modified.

Within PVI level, ethanol intake increased its exon expression together with H3Ac and H3K27me2, a repression transcription mark. A lysine can be mono-, di- or tri-methylated, making transcription less permissible more a lysine is methylated, a hypothesis of this opposite enrichment of histones marks and the increase in BDNF exon IV expression, is a decreasing level of metylation on lysine 27 of the histone H3 allowing a less repression of the transcription. Finally, concerning PVIII, we observed a decrease in the marks of active transcription, H3Ac and H3K4me3, and an increase in H3K27me2, leading probably to the downregulation of the mRNA expression of the exon VIII.

Effect of ethanol intake on histone H2A variant Z in the hippocampus

The variant Z of the histone H2A has been shown to be involved in the cell cycle regulation, proliferation, survival of newborn cell and maintenance of cell fate (Taty-Taty *et al.*, 2014). Furthermore, H2A.Z was evidenced to be present at specific loci playing a role in the proliferation (Svotelis *et al.*, 2009). We decided to study the H2A.Z in the hippocampus of “ethanol” drinking mice and we observed a labeling of this histone only in the subgranular zone of the dentate gyrus supporting its implication in the regulation of proliferation. However, the quantification of H2A.Z⁺ cells revealed a decrease in its expression after chronic and free choice ethanol intake ($p = 0.0069$, Student t test).

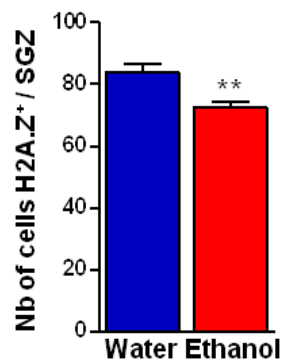


Figure A3. Histone H2A Z variant in the SVZ of “water” and “ethanol” mouse hippocampus. The number of H2A.Z-labeled cells, quantified in the DG of “water” and “ethanol” mouse hippocampus, was significantly lower in “ethanol” than in “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M of $n = 5$ (water) and $n = 8$ (ethanol) mice, ** $p < 0.01$, Student’s t test.

It has been reported that incorporation of H2A.Z in the nucleosome is important for gene expression regulation by facilitating permissive transcription (Faast *et al.*, 2001). We can hypothesize that chronic ethanol intake affected H2A.Z expression and induced changes in the nucleosome composition by replacing H2A.Z by another variant of H2A, leading to a dysregulation of gene transcription (Morillo-Huesca *et al.*, 2010). However, these changes in H2A.Z expression did not affect cell proliferation in the hippocampus of “ethanol” mice (Article 1).

Effect of chronic and voluntary ethanol consumption on plasmatic BDNF concentrations

In order to try to link the central effect of ethanol consumption on BDNF expression with a possible bio-marker, we analyzed the BDNF concentrations in the plasma after three weeks of chronic and voluntary ethanol intake. Results presented on Figure A4 show a significant increase in plasmatic BDNF concentrations in “ethanol” mice compared to “water” mice ($p = 0.0239$, Student t test). This analysis has been done on the same animals than the experiment presented in the article 1 related to the measure of BDNF concentrations in the hippocampus using ELISA assay.

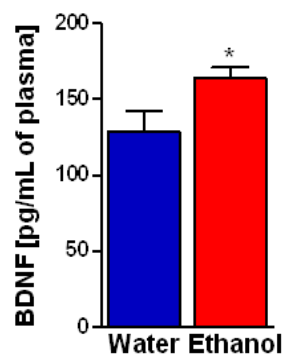


Figure A4. BDNF concentrations in water and ethanol mouse plasma. Plasmatic BDNF concentrations were determined by ELISA. Plasmatic BDNF concentrations were increased in “ethanol” compared to “water” mice. Each bar is the mean $\pm$ S.E.M of $n = 5$ (water) and $n = 9$ (ethanol) mice, * $p < 0.05$, Student’s t test.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des données présentées dans ce manuscrit montre que la consommation chronique d'éthanol en libre choix, chez les souris de la lignée C57BL/6J qui présentent une appétence élevée pour cette substance, est responsable de déficits cognitifs ciblant la fonctionnalité de l'hippocampe. Ces altérations des capacités d'apprentissage et de mémoire ne sont pas la conséquence d'une neurodégénérescence des cellules de l'hippocampe puisque, au contraire, nous avons observé une stimulation de la neurogenèse au niveau du gyrus denté. Cette activité neurogénique est sous le contrôle du facteur trophique BDNF et de ses voies de signalisation intracellulaire. La surexpression du BDNF semble être, en partie au moins, sous le contrôle de régulations épigénétiques sur son gène induites par l'éthanol.

A l'issue de cette thèse un certain nombre de questions se dégagent et celles-ci formeront l'essentiel de cette discussion. Ainsi, il sera important de s'interroger sur la contradiction apparente entre l'augmentation de la neurogenèse hippocampique et les détériorations des capacités cognitives de cette même aire cérébrale. Par ailleurs, le rôle joué par le BDNF et ses signalisations dans la régulation de la neurogenèse lors d'une consommation d'alcool sera abordé. Nous nous poserons aussi la question de la surexpression du BDNF : est-ce un mécanisme adaptatif compensatoire en réponse aux effets délétères de l'alcool ? Enfin la part que tiennent les mécanismes de régulation épigénétique dans le contexte de la prise d'alcool et de la neurogenèse sera discutée.

I – L'influence de l'éthanol sur la neurogenèse : le BDNF, unique acteur ?

L'observation de l'accroissement de la neurogenèse au niveau du gyrus denté après la consommation chronique d'éthanol nous a inévitablement amené à nous demander quels

étaient les facteurs responsables de cette stimulation. Dans la partie bibliographique concernant la régulation de la neurogenèse, nous avons détaillé le rôle des facteurs trophiques dans le contrôle de cette forme de plasticité. Lors de nos travaux, nous avons mis en évidence que la consommation d'éthanol provoquait une stimulation de l'expression de certains facteurs trophiques dont notamment le BDNF (Article 1). Le rôle du complexe BDNF/TrkB est fortement suggéré dans la régulation de la neurogenèse induite par la consommation d'éthanol car l'antagoniste spécifique du récepteur TrkB ANA-12, dont l'effet dépend de l'activation du TrkB par le BDNF, inhibe complètement l'augmentation de la prolifération cellulaire observée après cette consommation. De ces résultats ressortent deux points. Le premier est que la neurogenèse induite par l'éthanol est contrôlée par le BDNF et donc par les voies de signalisation en aval du TrkB. Le deuxième est que le blocage du complexe BDNF/TrkB par l'ANA-12 n'a d'effet que sur la prolifération cellulaire induite par l'éthanol. Nous n'avons pas observé de réduction par l'ANA-12 de la prolifération cellulaire des souris C57BL/6J consommant de l'eau, suggérant que la prolifération cellulaire basale adulte du gyrus denté est indépendante du BDNF. Ces résultats peuvent être rapprochés d'autres études montrant que le BDNF n'est pas essentiel à l'entrée en prolifération des précurseurs neuronaux mais exerce son rôle dans les phases plus tardives de la différenciation cellulaire et principalement dans la survie et la plasticité synaptique (Bruehl-Jungerman *et al.*, 2006 ; Cho *et al.*, 2013). Cet élément signifie également que la prolifération accentuée par d'autres conditions environnementales particulières comme par exemple l'exercice physique ou l'environnement enrichi, est probablement favorisée par un accroissement de l'expression du BDNF induite par ces environnements, comme le laissent d'ailleurs supposer des études de corrélation entre exercice physique et neurogenèse (Bechara and Kelly, 2013 ; Lee *et al.*, 2013 ; Ji *et al.*, 2014).

Nous avons montré que la stimulation de la neurogenèse était reliée à l'augmentation d'expression du BDNF. Néanmoins, ce sont les signalisations en aval du BDNF, et donc de son récepteur TrkB, qui sont les effecteurs de la neurogenèse, comme discuté dans le deuxième article. La stimulation des voies de signalisation intracellulaire provoque entre autres l'activation de CREB, dont la phosphorylation a lieu dans les différents stades de développement des cellules néoformées jusqu'à la production d'un neurone mature (Jagasia *et al.*, 2009). L'activation des voies de signalisation en aval du TrkB par cette prise d'éthanol confirme une fois de plus que la neurogenèse observée dans ces conditions expérimentales est bien contrôlée par la surexpression du BDNF.

Lors des différentes expérimentations menées chez les souris C57BL/6J, nous avons pu prélever le sang total de ces animaux. Le dosage du BDNF plasmatique a révélé une augmentation significative dans le sang des souris ayant consommées librement de l'alcool pendant 3 semaines, sans période d'abstinence, le sang étant prélevé juste à la fin de période nocturne (Additional results, Figure A4). Des études menées chez des patients alcoolo-dépendants ont révélé que les concentrations plasmatiques en BDNF étaient augmentées sous alcool (Lee *et al.*, 2009), alors qu'une période d'abstinence (sevrage) après une consommation chronique d'alcool était corrélée avec une diminution des concentrations plasmatiques en BDNF (Joe *et al.*, 2007).

Bien qu'intéressantes, ces données sont seulement associatives et il semble difficile de montrer un lien direct entre BDNF central et BDNF périphérique. Néanmoins, la barrière hémato-encéphalique étant perméable aux neurotrophines (Poduslo and Curran, 1996), il est possible d'imaginer que les modifications d'expression du BDNF au niveau central puissent être traduites en périphérie. Sachant que le plasma contient le BDNF capté et libéré par les plaquettes sanguines (Fujimura *et al.*, 2002), nous pourrions imaginer que les modifications

centrales observées dans notre modèle peuvent être retrouvées en périphérique. De plus, le BDNF n'est pas uniquement produit au niveau central, il l'est également par les cellules musculaires lisses, les monocytes, les lymphocytes mais aussi par les plaquettes (Nakahashi *et al.*, 2000 ; Donovan *et al.*, 1995). Par conséquent, une explication plus plausible serait que les modifications de la concentration sanguine en BDNF proviendraient de ces cellules dont le fonctionnement serait également altéré par la consommation d'éthanol. Néanmoins, l'établissement du BDNF en tant que marqueur biologique reflétant des atteintes centrales est à ce jour encore loin d'être effectif.

La réflexion sur les liens entre éthanol et neurogenèse hippocampique peut être poursuivie par une analyse plus globale de l'influence neurogénique de l'alcool intégrant ses effets neurobiologiques, mnésiques et appétitifs.

Les souris C57BL/6J sont celles qui absorbent le plus d'éthanol dans une protocole de libre choix (Belknap *et al.*, 1993) mais elles présentent néanmoins une alcoolémie relativement faible comparée aux quantités d'alcool pur consommées, et qui est de l'ordre de 0,5 g/L. Nous n'avons pas observé chez ces souris la neurodégénérescence hippocampique habituellement provoquée par une consommation chronique et forte d'éthanol (travaux présentés dans l'article 1). Ces données peuvent être discutées à la lumière d'autres études récemment publiées. Parmi elles, une s'est intéressée aux liens entre appétence à l'éthanol et neurogenèse hippocampique. La soumission de souris Swiss, non consanguines, au test de la préférence de place conditionnée à l'éthanol a résulté dans la formation de 3 groupes de souris ayant des comportements différents : un groupe qui présente une préférence de place conditionnée, un autre considéré comme évitant et le dernier indifférent au renforcement positif de l'éthanol. Les souris présentant une préférence de place conditionnée pour l'éthanol

n'avaient de modification ni de la prolifération cellulaire ni de la neurogenèse, alors que celles ayant un comportement d'évitement ou d'indifférence à l'exposition à l'éthanol montraient une réduction de la prolifération (Tesone-Coelho *et al.*, 2013). Ces données font émerger l'hypothèse du rôle de l'appétence et de l'effet récompensant de l'éthanol dans la régulation des phénomènes de neurodégénérescence ou de prolifération dans le cadre de l'exposition à l'éthanol. Plusieurs études ont montré que l'activation du système de récompense, par l'exercice physique par exemple, augmentait la neurogenèse hippocampique (Brene *et al.*, 2007). Par conséquent, le renforcement positif de l'alcool observé chez les souris Swiss dans le test de la préférence de place conditionnée, induisant une activation du circuit de la récompense (Tzschentke, 2007) provoquerait un maintien de la neurogenèse en dépit des effets néfastes de l'éthanol. En outre, il est possible que la mémoire hippocampique soit directement impliquée dans ce processus. L'effet appétitif de l'éthanol provoquerait un apprentissage contextuel du lieu de renforcement positif et permettrait de stimuler la neurogenèse (Tesone-Coelho *et al.*, 2013). Si nous transposons ces éléments à notre modèle, nous notons d'une part que lors de notre protocole d'alcoolisation en libre choix, 4 biberons sont présentés aux souris hébergées individuellement. Le fait d'observer une augmentation progressive de la quantité d'éthanol ingérée signifie que ces souris présentent une appétence de plus en plus élevée pour l'éthanol et que, potentiellement, nous avons un renforcement positif de l'éthanol. Ce renforcement n'existerait probablement pas chez des souris qui ne montrent qu'une très faible appétence pour l'éthanol comme par exemple les souris DBA/2J, chez qui l'exposition chronique à l'éthanol diminue la neurogenèse hippocampique (Paizanis *et al.*, 2009). De plus, dans notre protocole, sur les 4 biberons présentés aux souris, 3 sont remplis avec de l'éthanol et 1 avec de l'eau. Les souris voulant consommer de l'éthanol sont donc obligées d'identifier lesquels contiennent de l'éthanol. L'emplacement des biberons est modifié tous les deux jours ce qui pourrait favoriser l'activité hippocampique nécessaire à

identifier les nouveaux emplacements. Cette situation n'est pas présente pour les souris exposées à 4 biberons contenant de l'eau pendant toute la durée du protocole. Ces deux éléments, emplacement des biberons d'éthanol et le renforcement positif de l'éthanol, pourraient être en partie responsables de l'augmentation de la neurogenèse que nous observons.

La neurogenèse stimulée par la consommation chronique d'éthanol ne serait donc pas une régulation uniquement locale avec la surexpression du BDNF, mais la conséquence d'une interaction complexe entre les différents systèmes du cerveau qui intègrent aussi bien les effets propres de la molécule éthanol sur le tissu cérébral, et l'aspect motivationnel de la substance éthanol.

II – Les liens entre la prise d'éthanol et les régulations épigénétiques : mécanismes de la neuroadaptation ?

Nous avons montré que l'augmentation de la neurogenèse hippocampique était corrélée avec une stimulation des voies de signalisations dépendantes de l'activation du TrkB qui provoque l'activation par phosphorylation de CREB. CREB exerce son rôle de facteur de transcription en s'associant à l'enzyme CBP possédant une activité acétyltransférase permettant l'acétylation des histones, rendant ainsi la chromatine dans un état permissif pour la transcription (Yang and Seto, 2007). Il a d'ailleurs été démontré qu'un activateur spécifique de CBP induisait une augmentation de l'acétylation de l'histone H3, corrélée à une augmentation de la neurogenèse hippocampique (Chatterjee *et al.*, 2013). Néanmoins, dans notre modèle de prise d'alcool chronique, nous n'avons mis en évidence ni une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe (Article 1) ni de modifications dans l'expression de CBP (Additional results, Table A3). Ces données suggèrent que les

mécanismes épigénétiques dépendant de la liaison de CREB à CBP ne sont pas altérés, bien que l'expression et l'activation de CREB soient augmentées.

Inversement à l'effet de l'éthanol sur l'histone H3, une consommation chronique d'éthanol augmente l'acétylation de l'histone H4 dans l'hippocampe (Article 1). L'analyse de l'expression du gène *Myst2*, qui code une enzyme à activité acétyltransférase, n'a pas montré de modification de l'expression de ses transcrits (Additional results, Table A3) indiquant ainsi que d'autres enzymes interviennent dans l'acétylation de l'histone H4 lors de la consommation d'éthanol. Le fait de ne pas observer de modifications des enzymes impliquées dans l'acétylation des queues des histones nous a incités à analyser les enzymes impliquées dans la désacétylation, les HDACs. Nous avons pu montrer que l'expression génique de la plupart de celles-ci était diminuée après la prise chronique d'éthanol (Article 1), processus certainement responsable de l'augmentation de l'acétylation des histones, en l'absence de modification de l'expression des HATs. La modulation des enzymes HDAC indique que ces dernières sont très probablement reliées aux phénomènes de plasticité. Ainsi, l'inhibition de l'activité des HDACs avec l'acide valproïque induit une augmentation de l'expression des facteurs pro-neuronaux associée à une augmentation de l'acétylation de H4 et une stimulation de la différenciation cellulaire (Yu *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition des HDACs par le butyrate de sodium induit une augmentation de la neurogenèse corrélée à une augmentation de l'expression du BDNF et de la phosphorylation de CREB (Kim *et al.*, 2009). A partir de ces éléments, nous proposons que la consommation d'éthanol chez les souris C57BL/6J mène à une modulation plus spécifique des HDACs plutôt que des HATs, aboutissant à une augmentation de l'acétylation. Ce phénomène permettrait la stimulation d'expression des gènes pro-neuronaux impliqués dans les processus neurogéniques.

En plus des données concernant l'expression génique des HDACs présentées dans l'article 1, nous avons également analysé l'expression protéique des HDAC1 et 2. Nous avons montré que celle de HDAC2 était diminuée dans le gyrus denté après la prise chronique d'éthanol (Article 1). Concernant HDAC1, les résultats que nous avons obtenus sont contradictoires. Alors que nous observons une diminution de son expression génique, l'expression protéique est augmentée (Additional results, Figure A1B). Ces observations indiquent que des mécanismes de recyclage de la protéine sont mis en place afin de contrer la baisse d'expression génique. Des études sur le *zebrafish* ont montré que l'enzyme HDAC1 était nécessaire au bon déroulement de la neurogenèse en réprimant les gènes inhibiteurs de la différenciation neuronale (Cunliffe, 2004). Les enzymes HDAC1 et HDAC2 ont probablement un rôle redondant dans les processus de spécification neuronale (Montgomery *et al.*, 2009) mais HDAC2 a été décrit comme étant indispensable à la neurogenèse adulte en promouvant la survie des cellules néoformées (Jawerka *et al.*, 2010). L'effet opposé de l'éthanol sur ces deux enzymes pourrait être expliqué par le fait que cette substance aurait d'avantage d'impact sur HDAC2 que sur HDAC1. L'inhibition d'expression protéique de HDAC2 conduirait donc à un mécanisme compensatoire en stimulant le recyclage de HDAC1 afin de garder un système en homéostasie.

Lors de l'analyse des modifications post-traductionnelles des histones dans l'hippocampe après une consommation chronique d'éthanol, nous avons observé une augmentation significative de la triméthylation de H3 (Article 1). H3K4me3 a été clairement montré pour intervenir dans les régulations de l'expression des gènes régulant la différenciation neuronale (Coskun *et al.*, 2012). Comme mentionné dans le premier article, H3K4me3 a également été relié à une augmentation d'expression des gènes riches en GC dans des études post-mortem sur des cerveaux de patients alcoolodépendants (Ponomarev *et al.*,

2012). L'analyse du profil de méthylation du gène du BDNF a permis de démontrer que la méthylation globale du BDNF dans les sous-régions CA1 et CA3 était diminuée (Article 2) et associée à une augmentation de H3K4me3 sur deux promoteurs du BDNF (Article 1) lors d'une consommation d'éthanol. L'ensemble de ces modifications épigénétiques participe probablement à l'augmentation d'expression du BDNF. En analysant les enzymes impliquées dans la régulation de la méthylation de l'ADN, nous avons observé que l'expression génique de DNMT3b et Gadd45b était diminuée après la consommation chronique d'éthanol (Article 2 ; Additional results, Table A3). La répression de DNMT3b semble cohérente avec les données obtenues sur la méthylation du BDNF. En revanche, la diminution de l'expression de Gadd45b apparaît être à l'encontre de ces données. En effet, cette enzyme impliquée dans la déméthylation de l'ADN est décrite pour promouvoir à la fois l'expression du BDNF au travers de la déméthylation de l'ADN, et la prolifération cellulaire ainsi que la croissance neuritique lors de la neurogenèse (Ma *et al.*, 2009). La déméthylation de l'ADN du BDNF ferait donc appel à d'autres enzymes dans le contexte de la consommation chronique d'éthanol.

Les changements de statut de méthylation de l'ADN affecte en aval la fixation des protéines liant l'ADN méthylé et notamment MeCP2 connue pour réguler l'expression du BDNF (Zouh *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2011). La phosphorylation de MeCP2 induite par l'activité neuronale permet sa libération des gènes cibles conduisant à une augmentation de la transcription génique. L'analyse de l'activation de MeCP2, induite par l'activité neuronale, a montré une diminution de la phosphorylation, sous-entendant une liaison augmentée à l'ADN. Comme MeCP2 est décrite comme en partie responsable de la répression de l'exon I et IV du BDNF, il était étonnant de ne pas observer de modifications de l'expression de ces exons. Cependant, la diminution de méthylation du gène du BDNF, même si elle reste faible, pourrait influencer la liaison de MeCP2 à l'ADN.

Pour terminer cette partie consacrée à l'épigénétique, il sera intéressant de replacer nos données dans le contexte de l'addiction en général. La plupart des études se sont attachées aux mécanismes épigénétiques sous-tendant la neuroadaptation dans le circuit de la récompense responsable de l'effet renforçant produit par les drogues d'abus.

La prise chronique de cocaïne induit des modifications d'acétylation de l'histone H3 associée à la fois à une activation du gène du BDNF dans le striatum (Kumar *et al.*, 2005) et une augmentation de l'expression protéique du BDNF dans le cortex préfrontal (Sadri-Vakili *et al.*, 2010). L'étude de l'implication des HDACs dans les processus de récompense vis-à-vis d'une prise de drogue a montré que la délétion génique de HDAC1, mais pas de HDAC2, atténuait les réponses comportementales habituellement associées à la prise de cocaïne (Kennedy *et al.*, 2013). La redondance de ces deux HDACs mentionnée plus haut, semble donc être remise en question et le rôle de HDAC1 dans la neuroadaptation induite par la prise de drogue semble être ici prépondérante.

Par ailleurs, la prise chronique de cocaïne réduit fortement la diméthylation de H3K9 associée à l'inhibition de l'enzyme G9a, responsable de cette modification post-traductionnelle (Maze *et al.*, 2010). De plus, l'invalidation génétique de G9a induit une augmentation de l'arborisation dendritique dans le noyau accumbens suggérant que H3K9me2 et G9a pourraient être liées à la neuroadaptation induite par la prise de drogue (Maze *et al.*, 2010). La méthylation sur H3K9 est une modification d'histone que nous n'avons pas explorée et pourrait être une cible pertinente dans les mécanismes de plasticité dans le contexte de l'addiction à l'éthanol.

La méthylation de l'ADN est un domaine encore relativement peu étudié dans le cadre de la consommation de drogue. Néanmoins, des données montrent que parmi les méthyltransferase, la DNMT3a est celle qui est la plus affectée dans le noyau accumbens par la prise chronique de cocaïne (Anier *et al.*, 2010 ; LaPlant *et al.*, 2010). La surexpression de

cette enzyme conduit à une diminution des phénomènes de récompense à la cocaïne ainsi qu'à une augmentation de la densité des épines dendritiques, impliquées dans la plasticité synaptique (Laplant *et al.*, 2010). Chez nos souris ayant consommé de l'éthanol, l'expression de la DNMT3a n'est pas modifiée significativement mais semble tendre vers une augmentation. Il est envisageable que son expression soit modifiée localement et que nous ne la décelions pas dans l'hippocampe entier.

Enfin, CREB, qui est augmenté dans l'hippocampe des souris ayant consommé de l'éthanol pendant 3 semaines, est connu pour être relié aux mécanismes de préférence et de dépendance à l'alcool. Des rats préférant pour l'alcool ont des niveaux plus bas de CREB, et de P-CREB, dans l'amygdale comparés à des rats non-préférant (Pandey *et al.*, 1999), et un traitement aiguë avec l'éthanol induit une augmentation de l'activation de CREB corrélée à une diminution du niveau d'anxiété uniquement chez les rats préférant (Pandey *et al.*, 2005). Ces différences d'expression et d'activation de CREB influencent certainement le niveau d'acétylation des histones et par conséquent l'expression des gènes cibles de CREB. Bien que nous n'ayons exploré CREB que dans l'hippocampe, il est possible que chez les souris C57BL/6J, les niveaux basaux de CREB soient diminués dans l'ensemble du cerveau, diminution qui serait responsable d'une appétence plus élevée.

III – La prise d'éthanol influence la plasticité synaptique : une évidence ?

Nous avons montré que la surexpression du BDNF était la résultante d'un remodelage de la chromatine impliquant à la fois la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Comme illustré dans le tableau A4 (Additional results), nous avons observé que selon le promoteur et la modification d'histone considérés, les changements étaient extrêmement variables. Les mécanismes épigénétiques menant à une augmentation de l'expression des exons II, III et VI du BDNF, ne sont pas homogènes. En

revanche, la diminution d'expression de l'exon VIII semble être plus claire. L'éthanol induit sur son promoteur à la fois une diminution des marques représentatives de l'activation de la transcription telles que H3Ac et H3K4me3 et une augmentation d'une marque représentative de la répression H3K27me2. Ces données montrent que les mécanismes épigénétiques aboutissant à la surexpression protéique du BDNF sont hautement complexes et permettent certainement d'obtenir une expression du BDNF finement contrôlée. Cette hypothèse nous amène à nous poser d'autres questions. Pourquoi le BDNF possède-t-il une organisation si complexe ? Quel est l'intérêt de posséder tant d'exons pour aboutir à une seule et unique protéine mature ? Des études s'intéressant à la ségrégation spatiale des transcrits du BDNF apportent certainement un début d'explication. Il a été montré que les différents exons du BDNF ont des localisations subcellulaires différentes (Baj *et al.*, 2011), ce qui induirait des effets cellulaires différents. Ainsi, les exons I et IV participeraient au développement des dendrites proximales et les exons II et VI seraient d'avantage impliqués dans l'architecture des dendrites distales (Baj *et al.*, 2011) (Figure 19).

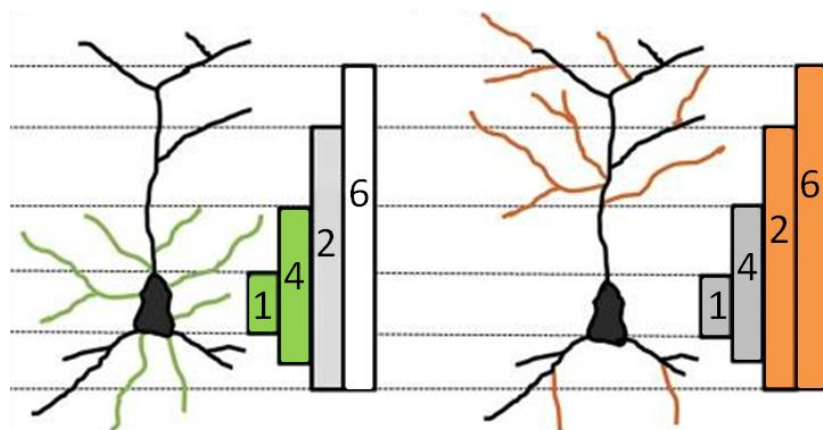


Figure 19. Représentation de la ségrégation spatiale des exons I, II, IV et VI du BDNF. Les exons I et IV sont localisés préférentiellement au niveau des dendrites proximales (vert) et les exons II et VI au niveau des dendrites distales (orange) (Adaptée de Baj *et al.*, 2011).

Ces modulations de la répartition subcellulaire des exons du BDNF permettraient de façonner des régions cellulaires différemment en fonction des besoins. Se basant sur ces

données, la même équipe de recherche a démontré que l'exercice physique et un traitement avec un antidépresseur induisaient une augmentation de l'expression dendritique de l'exon VI du BDNF chez la souris C57BL/6J au niveau de CA1, CA3 et du DG, procurant un support trophique pour les neurones (Baj *et al.*, 2012). Dans notre modèle de prise chronique d'alcool, nous observons une expression stimulée de l'exon II et VI suggérant probablement la favorisation du développement dendritique distal sans que celui des dendrites proximales ne soit altéré.

La localisation dendritique du BDNF que nous venons d'exposer nous amène à explorer le rôle de ce facteur trophique dans la plasticité synaptique. L'implication du BDNF dans la LTP, une forme de plasticité synaptique, a été montrée comme étant effective grâce à des souris invalidées pour le gène du BDNF. Les souris n'exprimant plus le BDNF dans l'hippocampe présentent une diminution de l'amplitude de la LTP enregistrée au niveau des synapses entre les collatérales de Schaffer et CA1, qui pouvait être restaurée par l'application exogène de BDNF (Patterson *et al.*, 1996) ou par l'injection d'un adénovirus permettant la réexpression du BDNF (Korte *et al.*, 1996). Récemment, il a été démontré que les vésicules contenant le BDNF se situaient dans la zone présynaptique des neurones glutamatergiques de l'hippocampe (Dieni *et al.*, 2012 ; Andreska *et al.*, 2014). La libération du BDNF de ces vésicules est dépendante de l'activité et permettrait une réorganisation synaptique locale impliquée dans les processus de mémorisation (Lu *et al.*, 2008). Afin d'explorer les conséquences fonctionnelles de l'augmentation de l'expression protéique du BDNF après la consommation chronique d'alcool, nous avons étudié l'état de la LTP au niveau de CA1. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de la plasticité synaptique chez les souris ayant consommé de l'éthanol. Comme évoqué dans l'article 2, il est fort probable que la durée de consommation soit trop courte et la quantité d'éthanol

consommée trop faible pour induire des changements significatifs dans cette forme de plasticité. Cependant, une autre explication est envisageable. Lors des expériences d'immunomarquage de la protéine BDNF, nous avons observé une localisation unique du BDNF au niveau de l'hilus du gyrus denté et de CA3. Le marquage au niveau de CA1 étant extrêmement faible voir inexistant. Il est probable que dans notre modèle d'étude, l'alcool n'induit pas de changement de l'expression du BDNF au niveau de CA1 ce qui serait compatible avec une absence de modification de la LTP.

IV – L'éthanol et la mémoire : une relation conflictuelle

Comme nous l'avons déjà évoqué, la LTP est un modèle cellulaire de la plasticité synaptique reflétant les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. Jusqu'à présent, l'ensemble de nos données montre un effet plus favorable que néfaste de la consommation chronique d'alcool sur l'hippocampe. Cependant, l'éthanol induit un déficit d'apprentissage à la fois dans le test de reconnaissance d'objets et dans le conditionnement contextuel à la peur. Ces résultats sont en accord avec la littérature et indiquent également que ce sont les fonctions dépendantes de l'hippocampe qui sont préférentiellement altérées par l'éthanol et pas celles dépendantes de l'amygdale puisque l'extinction du son dans le test de conditionnement à la peur n'a pas montré de différence entre les animaux ayant consommé de l'éthanol et ceux ayant eu accès à de l'eau uniquement. Nos données montrent d'une part que l'éthanol interfère avec les processus d'encodage, à la fois dans le test de la reconnaissance d'objet et dans le conditionnement à la peur, et d'autre part que la mémoire à long terme est la seule à être affectée. Comme évoqué dans l'article 2, la concentration d'éthanol semble jouer un rôle prépondérant dans la détérioration des fonctions cognitives. En effet, des concentrations faibles en éthanol vont induire des déficits de la mémoire hippocampe dépendante alors que des concentrations plus élevées provoquent des détériorations des fonctions de l'hippocampe

et de l'amygdale (Melia *et al.*, 1996). Nous pouvons corrélérer ces résultats à notre modèle puisque la consommation chronique et libre d'éthanol des souris C57BL/6J ne conduit qu'à une alcoolémie de l'ordre de 0,5 g/L, ce qui reste faible par rapport à la quantité d'alcool pur consommée. Ces déficits cognitifs impliquant l'hippocampe ont été corrélés à un hypofonctionnement de cette structure par la mise en évidence d'une diminution du marqueur d'activité neuronale c-fos (Melia *et al.*, 1996). L'hypofonctionnement de l'hippocampe pourrait être lié à une modification d'activité des récepteurs GABA et NMDA. En effet, comme évoqué dans le chapitre consacré aux rappels bibliographiques, l'alcool potentialise l'activité des récepteurs GABA créant ainsi une augmentation de la neurotransmission inhibitrice et pouvant être responsable des détériorations des performances cognitives (Whissel *et al.*, 2013). De même, l'inhibition des récepteurs NMDA provoque une diminution de la neurotransmission excitatrice qui semble être responsable de faibles performances mnésiques (Rowland *et al.*, 2005). Ainsi, l'alcool en provoquant des modulations de ces deux neurotransmissions pourrait être responsable de cette détérioration des capacités cognitives dépendantes de l'hippocampe. Néanmoins, la modulation de ces neurotransmissions n'a pas provoqué, dans nos conditions expérimentales, des modifications de la plasticité synaptique puisque nous n'avons pas observé de perturbations de la LTP dans l'hippocampe des souris ayant consommées de l'éthanol.

A partir de ces données, comment expliquer qu'aucun effet nuisible au niveau structurel et fonctionnel ne soit détecté dans l'hippocampe alors qu'au niveau comportemental nous observons une détérioration des capacités cognitives ? Plusieurs hypothèses sont envisageables.

(1) La consommation chronique et libre d'éthanol par les souris C57BL/6J induit une détérioration structurelle que nous n'avons pas réussie à mettre en évidence. L'observation d'un accroissement de la neurogenèse et de l'expression du BDNF serait un

mécanisme compensatoire afin de contrecarrer les effets délétères de l'éthanol sur l'hippocampe. En effet, nous avons évoqué dans la partie introductive qu'une consommation courte d'éthanol peut induire une augmentation de l'expression du BDNF pour compenser les effets neurotoxiques de l'éthanol, et que ce mécanisme échouerait à garder l'homéostasie du système lors d'expositions prolongées (McGough *et al.*, 2004 ; Miller, 2004 ; Miller *et al.*, 2004). Cette hypothèse est également appuyée par le fait que nous n'avons pas observé de changements dans la LTP. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Article 1, Supplementary Figure S2) suggérant que d'autres mécanismes contribuent à la détérioration des fonctions de l'hippocampe.

(2) Des études anciennes ont montré que la consommation chronique ou l'exposition prolongée d'éthanol induisait un hypofonctionnement cholinergique dans le cerveau de rat (Floyd *et al.*, 1997) ainsi qu'une perte des fibres cholinergiques au niveau du gyrus denté, de CA3 et de CA1 (Cadete-Leite *et al.*, 1995). Il est donc envisageable que dans nos conditions expérimentales, le tonus cholinergique soit diminué ce qui expliquerait que les fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe soient altérées. En effet, il a été démontré que la diminution de libération d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe chez des rats traités à l'éthanol était corrélée à des déficits mnésiques dépendants de l'hippocampe (Melis *et al.*, 1996).

(3) Enfin, bien que l'hippocampe soit la structure centrale des fonctions cognitives explorées dans nos travaux, il n'est pas le seul à intervenir dans ces processus mnésiques. D'autres structures sont en relation avec l'hippocampe comme par exemple le cortex entorhinal ou le cortex préfrontal (Takehara-Nishiuchi, 2014), et peuvent subir une neurodégénérescence induite par l'éthanol (Cippitelli *et al.*, 2010 ; Kumral *et al.*, 2005). Par conséquent, il est possible que les déficits cognitifs observés dans notre modèle soient liés à

une perte neuronale dans d'autres structures cérébrales qui sont également impliquées dans les processus mnésiques que nous avons analysés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons pu clairement démontrer que chez les souris de la lignée C57BL/6J, la consommation chronique d'éthanol induisait des déficits cognitifs qui sont dépendants de la fonction de l'hippocampe. L'observation d'un accroissement de la prolifération neuronale dans le gyrus denté est à l'encontre de ce qui est généralement attendu d'une consommation d'éthanol, et contradictoire avec les performances mnésiques de ces souris. Si nous tracions une ligne entre prise chronique d'éthanol et neurogenèse, nous placerions en son centre le BDNF associé aux modifications épigénétiques sur son gène permettant de réguler cette forme de neuroplasticité (Figure 20).

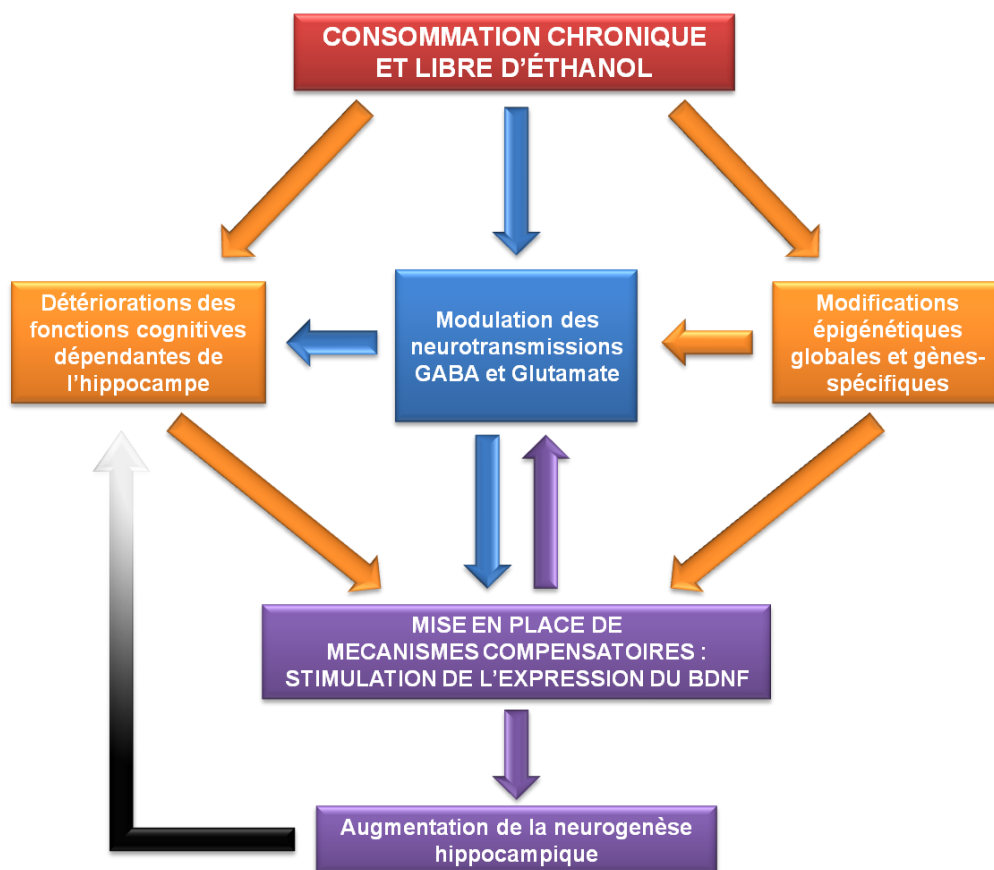


Figure 20. La consommation chronique et libre d'éthanol et ses conséquences. La prise chronique d'éthanol induit des modulations des neurotransmissions GABAergique et glutamatergique, ainsi que des modifications épigénétiques et des détériorations des fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe. Ces altérations conduisent à une stimulation de l'expression du BDNF et de la neurogenèse afin de compenser ces déficits cognitifs.

Chez des souris C57BL/6J âgées, une amélioration de certaines performances cognitives est observée lorsqu'elles ont été exposées à l'éthanol à l'âge adulte, corrélée à une restauration de l'expression de la neurogranine, protéine impliquée dans la plasticité synaptique et dont l'expression décline avec l'âge (Krazem *et al.*, 2003a,b). En considérant uniquement l'hippocampe, l'effet stimulant de l'éthanol sur la mémoire pourrait être probablement médié par l'augmentation de la neurogenèse à l'âge adulte et par la facilitation de la plasticité synaptique hippocampique avec l'âge. Cependant, nos résultats montrent que la situation est différente chez l'adulte et que l'alcool induit plutôt une dégradation des fonctions cognitives.

La neurogenèse n'est probablement pas responsable de cette altération en interférant avec le réseau neuronal préexistant. La neurogenèse induite par l'éthanol, et contrôlée par le BDNF, pourrait être une simple réponse compensatoire et/ou adaptative pour tenter de contrer les effets délétères de l'éthanol. Pour compléter ce travail de thèse, il sera indispensable d'évaluer d'autres types de mémoire, comme par exemple la mémoire spatiale indissociable de l'hippocampe. La neurogenèse hippocampique étant impliquée dans les phénomènes de flexibilité cognitive, il sera pertinent d'évaluer cette forme de mémoire dans nos conditions expérimentales. Comme nous n'avons détecté aucun effet neurotoxique dans l'hippocampe après la consommation chronique d'alcool chez ces animaux, l'analyse d'autres structures cérébrales, en priorité celles liées aux mémoires affectées devra être menée.

Nous avons émis l'hypothèse que la stimulation de l'expression du BDNF et de la neurogenèse pourrait être liée à une exposition courte à l'éthanol, et constituerait un mécanisme compensatoire aux effets délétères de l'alcool qui pourrait s'échapper avec le temps. Il sera envisageable d'effectuer un suivi longitudinal du développement de la neurogenèse et des facteurs associés, sur une période beaucoup plus longue, afin de

déterminer si nous sommes en présence d'un mécanisme adaptatif en réponse aux effets de l'éthanol.

Ensuite, il sera important d'évaluer les neurotransmissions qui pourraient être altérées chez les souris C57BL/6J dans un tel protocole. Outre ses effets sur le système sérotoninergiques précédemment décrites (Kelaiï *et al.* 2008), les systèmes GABAergique et/ou glutamatergique, constituent probablement une porte d'entrée de l'effet de l'éthanol sur des cibles intracellulaires qui, à leur tour, vont provoquer les effets épigénétiques que nous avons décrits.

Enfin, la comparaison de cette lignée consanguine avec une autre comme la lignée DBA2/J, qui ne présente pas d'appétence pour l'éthanol mais plutôt une aversion, apportera certainement des informations sur les possibles mécanismes qui sont impliquées à la fois dans la prise d'éthanol et dans la neurogenèse.

EPILOGUE

Pendant toute la durée de la préparation de ma thèse, lors de discussions avec mon entourage au sujet de mon projet de recherche, une question était inévitablement posée : « alors, finalement boire de l'alcool est bon pour le cerveau ? ». Après l'exposé de l'ensemble des données obtenues pendant mon travail de thèse, il est possible de répondre sans réserve à cette question : l'alcool n'est pas bon pour le cerveau. L'éthanol, molécule active de l'alcool, reste un psychostimulant et comme tous les composés possédant cette propriété, il provoque des modifications structurelles et fonctionnelles qui perturbent l'homéostasie originelle du système nerveux central.

La découverte de l'alcool date probablement de la sédentarisation de l'homme mais sa consommation, de façon sociale et source de plaisir, comme nous la connaissons actuellement daterait de 4 000 à 3 000 ans avant Jésus Christ (Chapuis, 1989). Néanmoins, si l'alcool était vraiment si nocif pour notre cerveau, notre organisme n'aurait-il pas fait en sorte de s'adapter afin de contrer ses effets, comme il a su s'adapter à l'environnement extrême ou notre style de vie stressant ? Ou sommes-nous encore trop jeunes sur l'échelle de l'évolution pour avoir acquis dans notre patrimoine génétique les adaptations nécessaires pour ne pas être affectés par les effets néfastes de l'alcool ?

Je vous laisse sur cette réflexion et je vous remercie de m'avoir lu jusqu'au bout.

Emilien Stragier

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aberg E, Hofstetter CP, Olson L, Brene S (2005) Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:557-567.
- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896-2903.
- Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, Alborn AM, Carlsson-Skewir C, Bang P, Rosengren LE, Olsson T, Gage FH, Eriksson PS (2003) IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 24:23-40.
- Ables JL, Decarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, Radtke F, Hsieh J, Eisch AJ (2010) Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30:10484-10492.
- Adcock IM, Ford P, Ito K, Barnes PJ (2006) Epigenetics and airways disease. *Respir Res* 7:21.
- Addolorato G, Leggio L, Ferrulli A, Cardone S, Bedogni G, Caputo F, Gasbarrini G, Landolfi R (2011) Dose-response effect of baclofen in reducing daily alcohol intake in alcohol dependence: secondary analysis of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcohol Alcohol* 46:312-317.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85:525-535.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2009) Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61:187-202.
- Akbar M, Baick J, Calderon F, Wen Z, Kim HY (2006) Ethanol promotes neuronal apoptosis by inhibiting phosphatidylserine accumulation. *J Neurosci Res* 83:432-440.
- Aloe L Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Arch Ital Biol* 149:175-181.
- Anders DL, Blevins T, Smothers CT, Woodward JJ (2000) Reduced ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by deletion of the NR1 C0 domain or overexpression of alpha-actinin-2 proteins. *J Biol Chem* 275:15019-15024.
- Anderson ML, Sisti HM, Curlik DM, 2nd, Shors TJ (2011) Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period. *Eur J Neurosci* 33:175-181.
- Andreska T, Aufmkolk S, Sauer M, Blum R (2014) High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci* 8:107.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 35:2450-2461.
- Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7:1088-1095.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1469.
- Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, Yamada Y (2012) Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development* 139:667-677.
- Ariwodola OJ, Weiner JL (2004) Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA(B) receptors. *J Neurosci* 24:10679-10686.
- Aufrere G, Le Bourhis B, Beauge F (1997) Ethanol intake after chronic intoxication by inhalation of ethanol vapour in rats: behavioural dependence. *Alcohol* 14:247-253.

B

- Backstrom P, Bachteler D, Koch S, Hyytia P, Spanagel R (2004) mGluR5 antagonist MPEP reduces ethanol-seeking and relapse behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:921-928.

- Backstrom P, Hyytia P (2006) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor antagonism attenuates cue-induced cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* 31:778-786.
- Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, Tardito D, Langone F, Popoli M, Tongiorgi E (2012) Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology* 37:1600-1611.
- Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E (2011) Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16813-16818.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Doderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445:671-675.
- Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL (2003) Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol* 466:73-83.
- Batel P, Houchi H, Daoust M, Ramoz N, Naassila M, Gorwood P (2008) A haplotype of the DRD1 gene is associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 32:567-572.
- Bechara RG, Kelly AM (2013) Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behav Brain Res* 245:96-100.
- Becker HC, Veatch LM (2002) Effects of lorazepam treatment for multiple ethanol withdrawals in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 26:371-380.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53:261-277.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2711-2716.
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (1993) Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112:503-510.
- Bell RL, Rodd-Henricks ZA, Kuc KA, Lumeng L, Li TK, Murphy JM, McBride WJ (2003) Effects of concurrent access to a single concentration or multiple concentrations of ethanol on the intake of ethanol by male and female periadolescent alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol* 29:137-148.
- Beresford TP, Arciniegas DB, Alfors J, Clapp L, Martin B, Du Y, Liu D, Shen D, Davatzikos C (2006) Hippocampus volume loss due to chronic heavy drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1866-1870.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J (2012) The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74:634-639.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669-681.
- Bertotto ME, Maldonado NM, Bignante EA, Gorosito SV, Cambiasso MJ, Molina VA, Martijena ID (2011) ERK activation in the amygdala and hippocampus induced by fear conditioning in ethanol withdrawn rats: modulation by MK-801. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:892-904.
- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14:1008-1016.
- Bhave SV, Ghoda L, Hoffman PL (1999) Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19:3277-3286.
- Binda O (2013) On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics* 8:457-463.
- Blednov YA, Jung S, Alva H, Wallace D, Rosahl T, Whiting PJ, Harris RA (2003) Deletion of the alpha1 or beta2 subunit of GABAA receptors reduces actions of alcohol and other drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 304:30-36.

- Boehm SL, 2nd, Ponomarev I, Jennings AW, Whiting PJ, Rosahl TW, Garrett EM, Blednov YA, Harris RA (2004) gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochem Pharmacol* 68:1581-1602.
- Bonsch D, Lenz B, Kornhuber J, Bleich S (2005) DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *Neuroreport* 16:167-170.
- Bonsch D, Reulbach U, Bayerlein K, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S (2004) Elevated alpha synuclein mRNA levels are associated with craving in patients with alcoholism. *Biol Psychiatry* 56:984-986.
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317:1760-1764.
- Botia B, Legastelois R, Alaux-Cantin S, Naassila M (2012) Expression of ethanol-induced behavioral sensitization is associated with alteration of chromatin remodeling in mice. *PLoS One* 7:e47527.
- Boulle F, van den Hove DL, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J, Lesch KP, Lanfumey L, Steinbusch HW, Kenis G (2012) Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 17:584-596.
- Brene S, Bjornebekk A, Aberg E, Mathe AA, Olson L, Werme M (2007) Running is rewarding and antidepressive. *Physiol Behav* 92:136-140.
- Brodie MS, Appel SB (2000) Dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of C57BL/6J and DBA/2J mice differ in sensitivity to ethanol excitation. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1120-1124.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26:5888-5893.
- Brunig I, Penschuck S, Berninger B, Benson J, Fritschy JM (2001) BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABA(A) receptor surface expression. *Eur J Neurosci* 13:1320-1328.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus* 22:1795-1808.

C

- Cadete-Leite A, Andrade JP, Sousa N, Ma W, Ribeiro-da-Silva A (1995) Effects of chronic alcohol consumption on the cholinergic innervation of the rat hippocampal formation as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry. *Neuroscience* 64:357-374.
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ (2003) Variations in maternal care alter GABA(A) receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology* 28:1950-1959.
- Campbell RM, Tummino PJ (2014) Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark. *J Clin Invest* 124:64-69.
- Canossa M, Gartner A, Campana G, Inagaki N, Thoenen H (2001) Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *EMBO J* 20:1640-1650.
- Carta M, Ariwodola OJ, Weiner JL, Valenzuela CF (2003) Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6813-6818.
- Cattaneo E, McKay R (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347:762-765.
- Chandler LJ, Sutton G (2005) Acute ethanol inhibits extracellular signal-regulated kinase, protein kinase B, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate response element binding protein activity in an age- and brain region-specific manner. *Alcohol Clin Exp Res* 29:672-682.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* 318:444-447.
- Chatterjee S, Mizar P, Cassel R, Neidl R, Selvi BR, Mohankrishna DV, Vedamurthy BM, Schneider A, Bousiges O, Mathis C, Cassel JC, Eswaramoorthy M, Kundu TK, Boutillier AL (2013) A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice. *J Neurosci* 33:10698-10712.

- Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.
- Chen YC, Holmes A (2009) Effects of topiramate and other anti-glutamatergic drugs on the acute intoxicating actions of ethanol in mice: modulation by genetic strain and stress. *Neuropsychopharmacology* 34:1454-1466.
- Cheung WL, Turner FB, Krishnamoorthy T, Wolner B, Ahn SH, Foley M, Dorsey JA, Peterson CL, Berger SL, Allis CD (2005) Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 15:656-660.
- Cho T, Ryu JK, Taghibiglou C, Ge Y, Chan AW, Liu L, Lu J, McLarnon JG, Wang YT (2013) Long-term potentiation promotes proliferation/survival and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *PLoS One* 8:e76860.
- Ciccocioppo R, Panocka I, Frolidi R, Quitadamo E, Massi M (1999) Ethanol induces conditioned place preference in genetically selected alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)* 141:235-241.
- Cippitelli A, Damadzic R, Frankola K, Goldstein A, Thorsell A, Singley E, Eskay RL, Heilig M (2010) Alcohol-induced neurodegeneration, suppression of transforming growth factor-beta, and cognitive impairment in rats: prevention by group II metabotropic glutamate receptor activation. *Biol Psychiatry* 67:823-830.
- Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E (2004) Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* 14:802-807.
- Clayton AL, Mahadevan LC (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett* 546:51-58.
- Colombo G, Serra S, Vacca G, Carai MA, Gessa GL (2006) Baclofen-induced suppression of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats exposed to different alcohol concentrations. *Eur J Pharmacol* 550:123-126.
- Cooney CA, Dave AA, Wolff GL (2002) Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 132:2393S-2400S.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG (2004) Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77:155-165.
- Coskun V, Tsoa R, Sun YE (2012) Epigenetic regulation of stem cells differentiating along the neural lineage. *Curr Opin Neurobiol* 22:762-767.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol* 3:12-29.
- Cowen MS, Schroff KC, Gass P, Sprengel R, Spanagel R (2003) Neurobehavioral effects of alcohol in AMPA receptor subunit (GluR1) deficient mice. *Neuropharmacology* 45:325-333.
- Crabbe JC, Jr., Young ER, Kosobud A (1983) Genetic correlations with ethanol withdrawal severity. *Pharmacol Biochem Behav* 18 Suppl 1:541-547.
- Crabbe JC, Metten P, Cameron AJ, Wahlsten D (2005) An analysis of the genetics of alcohol intoxication in inbred mice. *Neurosci Biobehav Rev* 28:785-802.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK (1999) Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci* 22:173-179.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Feller DJ, Hen R, Wenger CD, Lessov CN, Schafer GL (1996) Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT1B serotonin receptors. *Nat Genet* 14:98-101.
- Crea F, Sun L, Mai A, Chiang YT, Farrar WL, Danesi R, Helgason CD (2012) The emerging role of histone lysine demethylases in prostate cancer. *Mol Cancer* 11:52.
- Crews FT, Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* 44:115-127.
- Crowder TL, Ariwodola OJ, Weiner JL (2006) Kainate receptor activation potentiates GABAergic synaptic transmission in the nucleus accumbens core. *Brain Res* 1088:73-82.
- Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, Berardi N, Brambilla R (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis* 33:358-368.

- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1.
- Cunliffe VT (2004) Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development* 131:2983-2995.
- Cunningham ME, Greene LA (1998) A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J* 17:7282-7293.

D

- Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JM (2005) The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 19:472-488.
- Dalla C, Bangasser DA, Edgecomb C, Shors TJ (2007) Neurogenesis and learning: acquisition and asymptotic performance predict how many new cells survive in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 88:143-148.
- Davis MI (2008) Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther* 118:36-57.
- de la Barre AE, Angelov D, Molla A, Dimitrov S (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J* 20:6383-6393.
- Delcuve GP, Khan DH, Davie JR (2012) Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* 4:5.
- Desroches D, Orevillo C, Verina D (1995) Sex- and strain-related differences in first-pass alcohol metabolism in mice. *Alcohol* 12:221-226.
- Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL (1997) Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* 69:126-130.
- Devaud LL, Smith FD, Grayson DR, Morrow AL (1995) Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Mol Pharmacol* 48:861-868.
- Dick DM, Bierut L, Hinrichs A, Fox L, Bucholz KK, Kramer J, Kuperman S, Hesselbrock V, Schuckit M, Almasy L, Tischfield J, Porjesz B, Begleiter H, Nurnberger J, Jr., Xuei X, Edenberg HJ, Foroud T (2006) The role of GABRA2 in risk for conduct disorder and alcohol and drug dependence across developmental stages. *Behav Genet* 36:577-590.
- Dick DM, Edenberg HJ, Xuei X, Goate A, Kuperman S, Schuckit M, Crowe R, Smith TL, Porjesz B, Begleiter H, Foroud T (2004) Association of GABRG3 with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 28:4-9.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196:775-788.
- Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M (2008) JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 107:50-60.
- Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif S, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L, et al. (1995) Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 147:309-324.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14385-14390.
- Drew MR, Denny CA, Hen R (2010) Arrest of adult hippocampal neurogenesis in mice impairs single- but not multiple-trial contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 124:446-454.

- Duveau V, Laustela S, Barth L, Gianolini F, Vogt KE, Keist R, Chandra D, Homanics GE, Rudolph U, Fritschy JM (2011) Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:362-373.

E

- Edenberg HJ (2007) The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health* 30:5-13.
- Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, Crowe RR, Goate A, Hesselbrock V, Jones K, Kwon J, Li TK, Nurnberger JI, Jr., O'Connor SJ, Reich T, Rice J, Schuckit MA, Porjesz B, Foroud T, Begleiter H (2004) Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am J Hum Genet* 74:705-714.
- Ehm O, Goritz C, Covic M, Schaffner I, Schwarz TJ, Karaca E, Kempkes B, Kremmer E, Pfrieger FW, Espinosa L, Bigas A, Giachino C, Taylor V, Frisen J, Lie DC (2010) RBPJkappa-dependent signaling is essential for long-term maintenance of neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 30:13794-13807.
- Emsley JG, Hagg T (2003) Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 183:298-310.
- Epp JR, Scott NA, Galea LA (2011) Strain differences in neurogenesis and activation of new neurons in the dentate gyrus in response to spatial learning. *Neuroscience* 172:342-354.
- Ericson M, Haythornthwaite AR, Yeh PW, Yeh HH (2003) Brain-derived neurotrophic factor mitigates chronic ethanol-induced attenuation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 73:722-730.
- Eriksson K (1968) Ethyl alcohol consumption: valid measurement in albino rats. *Science* 161:76-77.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072-1083.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.

F

- Faast R, Thonglairoam V, Schulz TC, Beall J, Wells JR, Taylor H, Matthaei K, Rathjen PD, Tremethick DJ, Lyons I (2001) Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11:1183-1187.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18:2803-2812.
- Fadda F, Mosca E, Colombo G, Gessa GL (1989) Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism. *Life Sci* 44:281-287.
- Fahlke C, Hard E, Eriksson CJ, Engel JA, Hansen S (1995) Consequence of long-term exposure to corticosterone or dexamethasone on ethanol consumption in the adrenalectomized rat, and the effect of type I and type II corticosteroid receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 117:216-224.
- Fahlke C, Hard E, Hansen S (1996) Facilitation of ethanol consumption by intracerebroventricular infusions of corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)* 127:133-139.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Faulkner TP, Cantleberry SB, Watts VJ, Hussain AS (1990) Comparative pharmacokinetics of ethanol in inbred strains of mice using doses based on total body water. *Alcohol Clin Exp Res* 14:82-86.
- Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326:483-504.

- Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK (2004) Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131:3805-3819.
- Floyd EA, Young-Seigler AC, Ford BD, Reasor JD, Moore EL, Townsel JG, Rucker HK (1997) Chronic ethanol ingestion produces cholinergic hypofunction in rat brain. *Alcohol* 14:93-98.
- Fowler AK, Hewetson A, Agrawal RG, Dagda M, Dagda R, Moaddel R, Balbo S, Sanghvi M, Chen Y, Hogue RJ, Bergeson SE, Henderson GI, Kruman, II (2012) Alcohol-induced one-carbon metabolism impairment promotes dysfunction of DNA base excision repair in adult brain. *J Biol Chem* 287:43533-43542.
- Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP (2007) Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 26:47-55.
- Frye GD, McCown TJ, Breese GR (1983) Differential sensitivity of ethanol withdrawal signs in the rat to gamma-aminobutyric acid (GABA)mimetics: blockade of audiogenic seizures but not forelimb tremors. *J Pharmacol Exp Ther* 226:720-725.
- Fujii S, Yamazaki Y, Sugihara T, Wakabayashi I (2008) Acute and chronic ethanol exposure differentially affect induction of hippocampal LTP. *Brain Res* 1211:13-21.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 87:728-734.

G

- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277:25748-25755.
- Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J (2009) Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12:1090-1092.
- Gao Z, Ure K, Ding P, Nashaat M, Yuan L, Ma J, Hammer RE, Hsieh J (2011) The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells. *J Neurosci* 31:9772-9786.
- Garro AJ, McBeth DL, Lima V, Lieber CS (1991) Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 15:395-398.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4:e5464.
- Garthe A, Huang Z, Kaczmarek L, Filipkowski RK, Kempermann G (2014) Not all water mazes are created equal: cyclin D2 knockout mice with constitutively suppressed adult hippocampal neurogenesis do show specific spatial learning deficits. *Genes Brain Behav*.
- Garthe A, Kempermann G (2013) An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci* 7:63.
- Gass JT, Olive MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218-265.
- Gatch MB (1999) Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1736-1743.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- George SR, Fan T, Ng GY, Jung SY, O'Dowd BF, Naranjo CA (1995) Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: reversal by increasing synaptic dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 273:373-379.
- Gerber M, Shilatfard A (2003) Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem* 278:26303-26306.
- Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES (2007) Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* 8:141-151.
- Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74:481-514.

- Gongwer MA, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1989) Regional brain contents of serotonin, dopamine and their metabolites in the selectively bred high- and low-alcohol drinking lines of rats. *Alcohol* 6:317-320.
- Gonzalez A, Lovic V, Ward GR, Wainwright PE, Fleming AS (2001) Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Dev Psychobiol* 38:11-32.
- Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G (1973) Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry* 28:238-243.
- Gorwood P, Lanfumey L, Hamon M (2004) [Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes]. *Med Sci (Paris)* 20:1132-1138.
- Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M (2002) Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7:11-17.
- Grahame NJ, Cunningham CL (1997) Intravenous ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 21:56-62.
- Green T, Nayeem N (2014) The multifaceted subunit interfaces of ionotropic glutamate receptors. *J Physiol* Jun 6. [Epub ahead of print].
- Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gartner A, Hoener MC, Nawa H, Kolbeck R, Thoenen H (1999) Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech* 45:262-275.
- Guo W, Ji Y, Wang S, Sun Y, Lu B (2014) Neuronal activity alters BDNF-TrkB signaling kinetics and downstream functions. *J Cell Sci*.

H

- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3:533-535.
- Halliday G, Ellis J, Heard R, Caine D, Harper C (1993) Brainstem serotonergic neurons in chronic alcoholics with and without the memory impairment of Korsakoff's psychosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 52:567-579.
- Hao HN, Parker GC, Zhao J, Barami K, Lyman WD (2003a) Differential responses of human neural and hematopoietic stem cells to ethanol exposure. *J Hematother Stem Cell Res* 12:389-399.
- Hao HN, Parker GC, Zhao J, Barami K, Lyman WD (2003b) Human neural stem cells are more sensitive than astrocytes to ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1310-1317.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20:5887-5897.
- Haslinger A, Schwarz TJ, Covic M, Lie DC (2009) Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:2103-2114.
- He J, Nixon K, Shetty AK, Crews FT (2005) Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur J Neurosci* 21:2711-2720.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7:1395-1402.
- Hendricson AW, Miao CL, Lippmann MJ, Morrisett RA (2002) Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Pharmacol Exp Ther* 301:938-944.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM (2003) Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7919-7924.
- Heyser CJ, Schulteis G, Koob GF (1997) Increased ethanol self-administration after a period of imposed ethanol deprivation in rats trained in a limited access paradigm. *Alcohol Clin Exp Res* 21:784-791.
- Hicks SD, Middleton FA, Miller MW (2010) Ethanol-induced methylation of cell cycle genes in neural stem cells. *J Neurochem* 114:1767-1780.

- Higuchi S, Matsushita S, Masaki T, Yokoyama A, Kimura M, Suzuki G, Mochizuki H (2004) Influence of genetic variations of ethanol-metabolizing enzymes on phenotypes of alcohol-related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1025:472-480.
- Hillman MG, Schneider CW (1975) Voluntary selection of and tolerance to 1,2 propanediol (propylene glycol) by high and low ethanol-selecting mouse strains. *J Comp Physiol Psychol* 88:773-777.
- Hodge RD, Kowalczyk TD, Wolf SA, Encinas JM, Rippey C, Enikolopov G, Kempermann G, Hevner RF (2008) Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J Neurosci* 28:3707-3717.
- Holter SM, Danysz W, Spanagel R (2000) Novel uncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptor antagonist MRZ 2/579 suppresses ethanol intake in long-term ethanol-experienced rats and generalizes to ethanol cue in drug discrimination procedure. *J Pharmacol Exp Ther* 292:545-552.
- Hsieh J (2012) Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev* 26:1010-1021.
- Hsu FC, Waldeck R, Faber DS, Smith SS (2003) Neurosteroid effects on GABAergic synaptic plasticity in hippocampus. *J Neurophysiol* 89:1929-1940.

I

- Iizuka M, Stillman B (1999) Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 274:23027-23034.
- Islam O, Gong X, Rose-John S, Heese K (2009) Interleukin-6 and neural stem cells: more than gliogenesis. *Mol Biol Cell* 20:188-199.
- Issa JP (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 32:31-43.
- Izumi Y, Murayama K, Tokuda K, Krishnan K, Covey DF, Zorumski CF (2007) GABAergic neurosteroids mediate the effects of ethanol on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 26:1881-1888.

J

- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009) GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29:7966-7977.
- Janak PH, Wolf FW, Heberlein U, Pandey SC, Logrip ML, Ron D (2006) BIG news in alcohol addiction: new findings on growth factor pathways BDNF, insulin, and GDNF. *Alcohol Clin Exp Res* 30:214-221.
- Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ (2002a) Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 13:1509-1513.
- Jang MH, Shin MC, Kim EH, Kim CJ (2002b) Acute alcohol intoxication decreases cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of rats. *Toxicol Lett* 133:255-262.
- Jawerka M, Colak D, Dimou L, Spiller C, Lagger S, Montgomery RL, Olson EN, Wurst W, Gottlicher M, Gotz M (2010) The specific role of histone deacetylase 2 in adult neurogenesis. *Neuron Glia Biol* 6:93-107.
- Jeanblanc J, Coune F, Botia B, Naassila M (2013a) Brain-derived neurotrophic factor mediates the suppression of alcohol self-administration by memantine. *Addict Biol*.
- Jeanblanc J, He DY, Carnicella S, Kharazia V, Janak PH, Ron D (2009) Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking. *J Neurosci* 29:13494-13502.
- Jeanblanc J, Logrip ML, Janak PH, Ron D (2013b) BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis. *Eur J Neurosci* 37:607-612.
- Jeppesen P, Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74:281-289.

- Ji JF, Ji SJ, Sun R, Li K, Zhang Y, Zhang LY, Tian Y (2014) Forced running exercise attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the neurocognitive deficits induced by whole-brain irradiation via the BDNF-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 443:646-651.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9:1067-1079.
- Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales RA (2007) Mu (mu) opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis. *Biol Psychiatry* 62:627-634.
- Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, Lee HJ, Kim DJ (2007) Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1833-1838.
- Joulie M, Miotto B, Defossez PA (2010) Mammalian methyl-binding proteins: what might they do? *Bioessays* 32:1025-1032.
- June HL, Sr., Foster KL, Eiler WJ, 2nd, Goergen J, Cook JB, Johnson N, Mensah-Zoe B, Simmons JO, June HL, Jr., Yin W, Cook JM, Homanics GE (2007) Dopamine and benzodiazepine-dependent mechanisms regulate the EtOH-enhanced locomotor stimulation in the GABAA alpha1 subunit null mutant mice. *Neuropsychopharmacology* 32:137-152.

K

- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999) Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401:918-921.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429:900-903.
- Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658-1662.
- Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo MM, Tarabykin V, Lie DC, Jessberger S (2011) Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5807-5812.
- Kasprzyk L, Defossez PA, Miotto B (2013) [Epigenetic regulation in neuronal differentiation and brain function]. *Biol Aujourd'hui* 207:1-17.
- Kelai S, Aissi F, Lesch KP, Cohen-Salmon C, Hamon M, Lanfumey L (2003) Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol Alcohol* 38:386-389.
- Kelai S, Renoir T, Chouchana L, Saurini F, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2008) Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 107:1660-1670.
- Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-5360.
- Kempermann G (2012) New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci* 13:727-736.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kennedy PJ, Feng J, Robison AJ, Maze I, Badimon A, Mouzon E, Chaudhury D, Damez-Werno DM, Haggarty SJ, Han MH, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2013) Class I HDAC inhibition blocks cocaine-induced plasticity by targeted changes in histone methylation. *Nat Neurosci* 16:434-440.
- Kesslak JP, So V, Choi J, Cotman CW, Gomez-Pinilla F (1998) Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav Neurosci* 112:1012-1019.

- Kim DJ, Park BL, Yoon S, Lee HK, Joe KH, Cheon YH, Gwon DH, Cho SN, Lee HW, NamGung S, Shin HD (2007a) 5' UTR polymorphism of dopamine receptor D1 (DRD1) associated with severity and temperament of alcoholism. *Biochem Biophys Res Commun* 357:1135-1141.
- Kim EJ, Leung CT, Reed RR, Johnson JE (2007b) In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *J Neurosci* 27:12764-12774.
- Kim HJ, Leeds P, Chuang DM (2009) The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain. *J Neurochem* 110:1226-1240.
- Kingston RE, Narlikar GJ (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13:2339-2352.
- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z, Moss SJ (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14871-14876.
- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Tretter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z, Moss SJ (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3616-3621.
- Koenig HN, Olive MF (2004) The glucocorticoid receptor antagonist mifepristone reduces ethanol intake in rats under limited access conditions. *Psychoneuroendocrinology* 29:999-1003.
- Kohnke MD (2008) Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol* 75:160-177.
- Kolb JE, Trettel J, Levine ES (2005) BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse* 55:52-57.
- Komitova M, Eriksson PS (2004) Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 369:24-27.
- Koponen E, Lakso M, Castren E (2004a) Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 130:81-94.
- Koponen E, Voikar V, Riekkari R, Saarelainen T, Rauramaa T, Rauvala H, Taira T, Castren E (2004b) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci* 26:166-181.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-8860.
- Korte M, Griesbeck O, Gravel C, Carroll P, Staiger V, Thoenen H, Bonhoeffer T (1996) Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12547-12552.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Krazem A, Marighetto A, Higuieret P, Jaffard R (2003a) Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav Brain Res* 147:17-29.
- Krazem A, Mons N, Higuieret P, Jaffard R (2003b) Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neurosci Lett* 338:62-66.
- Kroener S, Mulholland PJ, New NN, Gass JT, Becker HC, Chandler LJ (2012) Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One* 7:e37541.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455-463.
- Kruman, II, Henderson GI, Bergeson SE (2012) DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Exp Biol Med (Maywood)* 237:740-747.

- Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL (1999) Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 19:1165-1178.
- Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC (2003) N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 99:79-94.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303-314.
- Kumar S, Kralic JE, O'Buckley TK, Grobin AC, Morrow AL (2003) Chronic ethanol consumption enhances internalization of alpha1 subunit-containing GABAA receptors in cerebral cortex. *J Neurochem* 86:700-708.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, Morrow AL (2009) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205:529-564.
- Kumar S, Sieghart W, Morrow AL (2002) Association of protein kinase C with GABA(A) receptors containing alpha1 and alpha4 subunits in the cerebral cortex: selective effects of chronic ethanol consumption. *J Neurochem* 82:110-117.
- Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H (2005) Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 160:146-156.

L

- Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP (2008) Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 33:1724-1734.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, 3rd, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iniguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthal W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren Y, Eisch AJ, Bolanos CA, Kabbaj M, Xiao G, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan G, Morrison JH, Nestler EJ (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1137-1143.
- Larkin J, Goh XY, Vetter M, Pickering L, Swanton C (2012) Epigenetic regulation in RCC: opportunities for therapeutic intervention? *Nat Rev Urol* 9:147-155.
- Lavado A, Lagutin OV, Chow LM, Baker SJ, Oliver G (2010) Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol* 8.
- Le AD, Khanna JM, Kalant H, Grossi F (1986) Tolerance to and cross-tolerance among ethanol, pentobarbital and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav* 24:93-98.
- Le Bourhis B (1975) [Alcohol intoxication via the lung in rats]. *C R Seances Soc Biol Fil* 169:898-904.
- Lee BC, Choi IG, Kim YK, Ham BJ, Yang BH, Roh S, Choi J, Lee JS, Oh DY, Chai YG (2009a) Relation between plasma brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the male patients with alcohol dependence. *Alcohol* 43:265-269.
- Lee HY, Kim YK (2008) Plasma brain-derived neurotrophic factor as a peripheral marker for the action mechanism of antidepressants. *Neuropsychobiology* 57:194-199.
- Lee J, Duan W, Mattson MP (2002a) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82:1367-1375.
- Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002b) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 80:539-547.
- Lee MH, Amin ND, Venkatesan A, Wang T, Tyagi R, Pant HC, Nath A (2013) Impaired neurogenesis and neurite outgrowth in an HIV-gp120 transgenic model is reversed by exercise via BDNF production and Cdk5 regulation. *J Neurovirol* 19:418-431.

- Lee S, Roeder RG, Lee JW (2009b) Roles of histone H3-lysine 4 methyltransferase complexes in NR-mediated gene transcription. *Prog Mol Biol Transl Sci* 87:343-382.
- Lee YK, Park SW, Kim YK, Kim DJ, Jeong J, Myrick H, Kim YH (2005) Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol* 40:297-301.
- Legastelois R, Botia B, Naassila M (2013) Blockade of ethanol-induced behavioral sensitization by sodium butyrate: descriptive analysis of gene regulations in the striatum. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1143-1153.
- LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry* 36:395-421.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116:321-361.
- Li H, Zhong X, Chau KF, Williams EC, Chang Q (2011) Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory. *Nat Neurosci* 14:1001-1008.
- Li J, Li YH, Yuan XR (2003) Changes of phosphorylation of cAMP response element binding protein in rat nucleus accumbens after chronic ethanol intake: naloxone reversal. *Acta Pharmacol Sin* 24:930-936.
- Li TK, Lumeng L, Doolittle DP (1993) Selective breeding for alcohol preference and associated responses. *Behav Genet* 23:163-170.
- Liang J, Zhang N, Cagetti E, Houser CR, Olsen RW, Spigelman I (2006) Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci* 26:1749-1758.
- Liang T, Spence J, Liu L, Strother WN, Chang HW, Ellison JA, Lumeng L, Li TK, Foroud T, Carr LG (2003) alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4690-4695.
- Limosin F, Loze JY, Rouillon F, Ades J, Gorwood P (2003) Association between dopamine receptor D1 gene DdeI polymorphism and sensation seeking in alcohol-dependent men. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1226-1228.
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169-182.
- Little HJ, Croft AP, O'Callaghan MJ, Brooks SP, Wang G, Shaw SG (2008) Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol. *Neuroscience* 156:1017-1027.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Liu H, Hu Q, Kaufman A, D'Ercle AJ, Ye P (2008) Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J Neurosci Res* 86:537-543.
- Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD (2006) Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology* 31:1574-1582.
- Liu W, Tanasa B, Tyurina OV, Zhou TY, Gassmann R, Liu WT, Ohgi KA, Benner C, Garcia-Bassets I, Aggarwal AK, Desai A, Dorrestein PC, Glass CK, Rosenfeld MG (2010) PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466:508-512.
- Lovic V, Gonzalez A, Fleming AS (2001) Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood. *Dev Psychobiol* 39:19-33.
- Lovinger DM, White G, Weight FF (1990) NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci* 10:1372-1379.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603-614.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89:312-323.
- Luger K (2006) Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res* 14:5-16.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct

morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6:445-456.

M

- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H (2009) Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 323:1074-1077.
- Maccioni P, Zaru A, Loi B, Lobina C, Carai MA, Gessa GL, Capra A, Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F, Hyytia P, Lumeng L, Colombo G (2012) Comparison of the effect of the GABABeta receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator of the GABAB receptor, GS39783, on alcohol self-administration in 3 different lines of alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 36:1748-1766.
- MacLennan AJ, Lee N, Walker DW (1995) Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 197:105-108.
- Malpass GE, Williams HL, McMillen BA (2010) Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist memantine on the volitional consumption of ethanol by alcohol-preferring rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106:435-444.
- Manzardo AM, Henkhaus RS, Butler MG (2012) Global DNA promoter methylation in frontal cortex of alcoholics and controls. *Gene* 498:5-12.
- Mardones J, Segovia-Riquelme N (1983) Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol* 5:171-178.
- Marutha Ravindran CR, Ticku MK (2004) Changes in methylation pattern of NMDA receptor NR2B gene in cortical neurons after chronic ethanol treatment in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 121:19-27.
- Matthews DB, Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL (1998) Differential regulation of GABA(A) receptor gene expression by ethanol in the rat hippocampus versus cerebral cortex. *J Neurochem* 70:1160-1166.
- Matthews DB, Kralic JE, Devaud LL, Fritschy JM, Morrow AL (2000) Chronic blockade of N-methyl-D-aspartate receptors alters gamma-aminobutyric acid type A receptor peptide expression and function in the rat. *J Neurochem* 74:1522-1528.
- Maurel S, De Vry J, Schreiber R (1999) Comparison of the effects of the selective serotonin-reuptake inhibitors fluoxetine, paroxetine, citalopram and fluvoxamine in alcohol-preferring cAA rats. *Alcohol* 17:195-201.
- Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 327:213-216.
- Mc CG (1959) The genetics of mouse behavior in novel situations. *J Comp Physiol Psychol* 52:62-67.
- McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, Kharazia V, Janak PH, Ron D (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* 24:10542-10552.
- Meinhardt MW, Hansson AC, Perreau-Lenz S, Bauder-Wenz C, Stahlin O, Heilig M, Harper C, Drescher KU, Spanagel R, Sommer WH (2013) Rescue of infralimbic mGluR2 deficit restores control over drug-seeking behavior in alcohol dependence. *J Neurosci* 33:2794-2806.
- Melia KR, Ryabinin AE, Corodimas KP, Wilson MC, Ledoux JE (1996) Hippocampal-dependent learning and experience-dependent activation of the hippocampus are preferentially disrupted by ethanol. *Neuroscience* 74:313-322.
- Melis F, Stancampiano R, Imperato A, Carta G, Fadda F (1996) Chronic ethanol consumption in rats: correlation between memory performance and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Neuroscience* 74:155-159.
- Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol* 63:101-154.

- Meliska CJ, Bartke A, McGlacken G, Jensen RA (1995) Ethanol, nicotine, amphetamine, and aspartame consumption and preferences in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 50:619-626.
- Mermoud JE, Popova B, Peters AH, Jenuwein T, Brockdorff N (2002) Histone H3 lysine 9 methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 12:247-251.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* 389:385-389.
- Miller MW (2004) Repeated episodic exposure to ethanol affects neurotrophin content in the forebrain of the mature rat. *Exp Neurol* 189:173-181.
- Miller MW, Mooney SM (2004) Chronic exposure to ethanol alters neurotrophin content in the basal forebrain-cortex system in the mature rat: effects on autocrine-paracrine mechanisms. *J Neurobiol* 60:490-498.
- Miller R, King MA, Heaton MB, Walker DW (2002) The effects of chronic ethanol consumption on neurotrophins and their receptors in the rat hippocampus and basal forebrain. *Brain Res* 950:137-147.
- Ming Z, Criswell HE, Yu G, Breese GR (2006) Competing presynaptic and postsynaptic effects of ethanol on cerebellar purkinje neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1400-1407.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10:850-860.
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121-137.
- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401-414.
- Misra K, Pandey SC (2003) Differences in basal levels of CREB and NPY in nucleus accumbens regions between C57BL/6 and DBA/2 mice differing in inborn alcohol drinking behavior. *J Neurosci Res* 74:967-975.
- Misra K, Roy A, Pandey SC (2001) Effects of voluntary ethanol intake on the expression of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV and on CREB expression and phosphorylation in the rat nucleus accumbens. *Neuroreport* 12:4133-4137.
- Molet J, Bouaziz E, Hamon M, Lanfumey L (2012) Early exposure to ethanol differentially affects ethanol preference at adult age in two inbred mouse strains. *Neuropharmacology* 63:338-348.
- Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, Meuth S, Nagy A, Greene RW, Nestler EJ (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10827-10832.
- Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN (2009) Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7876-7881.
- Moonat S, Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Pandey SC (2013) Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism. *Biol Psychiatry* 73:763-773.
- Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (2010) Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67:73-88.
- Morillo-Huesca M, Clemente-Ruiz M, Andujar E, Prado F (2010) The SWR1 histone replacement complex causes genetic instability and genome-wide transcription misregulation in the absence of H2A.Z. *PLoS One* 5:e12143.
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835:259-265.
- Musumeci G, Sciarretta C, Rodriguez-Moreno A, Al Banchaabouchi M, Negrete-Diaz V, Costanzi M, Berno V, Egorov AV, von Bohlen Und Halbach O, Cestari V, Delgado-Garcia JM, Minichiello L (2009) TrkB modulates fear learning and amygdalar synaptic plasticity by specific docking sites. *J Neurosci* 29:10131-10143.

N

- Nagy J, Horvath C, Farkas S, Kolok S, Szombathelyi Z (2004) NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem Int* 44:17-23.
- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470:113-117.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20:966-976.
- Nevo I, Langlois X, Laporte AM, Kleven M, Koek W, Lima L, Maudhuit C, Martres MP, Hamon M (1995) Chronic alcoholization alters the expression of 5-HT1A and 5-HT1B receptor subtypes in rat brain. *Eur J Pharmacol* 281:229-239.
- Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K (2003a) Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1820-1825.
- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003b) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11:709-719.
- Nie Z, Madamba SG, Siggins GR (2000) Ethanol enhances gamma-aminobutyric acid responses in a subpopulation of nucleus accumbens neurons: role of metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 293:654-661.
- Niehrs C, Schafer A (2012) Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol* 22:220-227.
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9:1201-1213.
- Nixon K (2006) Alcohol and adult neurogenesis: roles in neurodegeneration and recovery in chronic alcoholism. *Hippocampus* 16:287-295.
- Nixon K, Crews FT (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83:1087-1093.
- Nixon K, Crews FT (2004) Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci* 24:9714-9722.
- Nuutinen S, Kiianmaa K, Panula P (2011) DARPP-32 and Akt regulation in ethanol-preferring AA and ethanol-avoiding ANA rats. *Neurosci Lett* 503:31-36.

O

- O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B (1992) Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 49:881-887.
- Obata K (2013) Synaptic inhibition and gamma-aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89:139-156.
- Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT (2002a) Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 26:547-557.
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT (2002b) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:521-532.
- Obrietan K, Gao XB, Van Den Pol AN (2002) Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism--a positive feedback circuit in developing neurons. *J Neurophysiol* 88:1005-1015.

- Okamoto H, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kuma H, Gu H, Li HP, Matsumoto Y, Yamaoka I, Fusumada K, Imagawa T, Wang ZY, Nakamura Y, Takeuchi Y (2006) Effects of chronic ethanol administration on the expression levels of neurotrophic factors in the rat hippocampus. *Okajimas Folia Anat Jpn* 83:1-6.
- Olive MF (2009) Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2:83-98.
- Ortiz S, Oliva JM, Perez-Rial S, Palomo T, Manzanares J (2004) Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol Alcohol* 39:88-92.
- Oscar-Berman M, Marinkovic K (2003) Alcoholism and the brain: an overview. *Alcohol Res Health* 27:125-133.
- Oscar-Berman M, Marinkovic K (2007) Alcohol: effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychol Rev* 17:239-257.

P

- Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, Melfort M, Gabriel C, Barden N, Mocaer E, Hamon M, Lanfumey L (2009) Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:759-774.
- Palachick B, Chen YC, Enoch AJ, Karlsson RM, Mishina M, Holmes A (2008) Role of major NMDA or AMPA receptor subunits in MK-801 potentiation of ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1479-1492.
- Pandey SC, Mittal N, Lumeng L, Li TK (1999) Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein gene transcription factor in genetic preference for alcohol drinking behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1425-1434.
- Pandey SC, Roy A, Zhang H, Xu T (2004) Partial deletion of the cAMP response element-binding protein gene promotes alcohol-drinking behaviors. *J Neurosci* 24:5022-5030.
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008a) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737.
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T (2005) Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest* 115:2762-2773.
- Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K (2008b) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci* 28:2589-2600.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14:383-400.
- Papadeas S, Grobin AC, Morrow AL (2001) Chronic ethanol consumption differentially alters GABA(A) receptor alpha1 and alpha4 subunit peptide expression and GABA(A) receptor-mediated 36 Cl(-) uptake in mesocorticolimbic regions of rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1270-1275.
- Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN (2011) Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* 18:534-544.
- Pascual M, Boix J, Felipo V, Guerri C (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem* 108:920-931.
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Guerri C (2012) Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* 62:2309-2319.

- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER (2001) Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* 32:123-140.
- Pederson DR, Gleason KE, Moran G, Bento S (1998) Maternal attachment representations, maternal sensitivity, and the infant-mother attachment relationship. *Dev Psychol* 34:925-933.
- Pena CJ, Bagot RC, Labonte B, Nestler EJ (2014) Epigenetic Signaling in Psychiatric Disorders. *J Mol Biol*.
- Peris J, Anderson KJ, Vickroy TW, King MA, Hunter BE, Walker DW (1997) Neurochemical basis of disruption of hippocampal long term potentiation by chronic alcohol exposure. *Front Biosci* 2:d309-316.
- Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Shear PK, Rosenbloom MJ, Lim KO (1995) Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1177-1191.
- Pfefferbaum A, Zahr NM, Mayer D, Vinco S, Orduna J, Rohlfing T, Sullivan EV (2008) Ventricular expansion in wild-type Wistar rats after alcohol exposure by vapor chamber. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1459-1467.
- Piazza PV, Le Moal M (1997) Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 25:359-372.
- Pinto E, Reggers J, Gorwood P, Boni C, Scantamburlo G, Pitchot W, Ansseau M (2008) The short allele of the serotonin transporter promoter polymorphism influences relapse in alcohol dependence. *Alcohol Alcohol* 43:398-400.
- Pleasure SJ, Collins AE, Lowenstein DH (2000) Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J Neurosci* 20:6095-6105.
- Poduslo JF, Curran GL (1996) Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res* 36:280-286.
- Pogo BG, Allfrey VG, Mirsky AE (1966) RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:805-812.
- Pomierny-Chamiolo L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M (2014) Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacol Ther* 142:281-305.
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32:1884-1897.
- Prioleau MN (2009) CpG islands: starting blocks for replication and transcription. *PLoS Genet* 5:e1000454.

Q

- Qiang M, Denny AD, Ticku MK (2007) Chronic intermittent ethanol treatment selectively alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit surface expression in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* 72:95-102.

R

- Radley JJ, Jacobs BL (2002) 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 955:264-267.
- Rai KS, Hattiangady B, Shetty AK (2007) Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. *Eur J Neurosci* 26:1765-1779.

- Rassnick S, Pulvirenti L, Koob GF (1992) Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 109:92-98.
- Ravanpay AC, Hansen SJ, Olson JM (2010) Transcriptional inhibition of REST by NeuroD2 during neuronal differentiation. *Mol Cell Neurosci* 44:178-189.
- Renthal W, Nestler EJ (2009) Histone acetylation in drug addiction. *Semin Cell Dev Biol* 20:387-394.
- Rewal M, Jurd R, Gill TM, He DY, Ron D, Janak PH (2009) Alpha4-containing GABAA receptors in the nucleus accumbens mediate moderate intake of alcohol. *J Neurosci* 29:543-549.
- Richardson HN, Chan SH, Crawford EF, Lee YK, Funk CK, Koob GF, Mandyam CD (2009) Permanent impairment of birth and survival of cortical and hippocampal proliferating cells following excessive drinking during alcohol dependence. *Neurobiol Dis* 36:1-10.
- Rietschel M, Treutlein J (2013) The genetics of alcohol dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1282:39-70.
- Risinger FO, Brown MM, Doan AM, Oakes RA (1998) Mouse strain differences in oral operant ethanol reinforcement under continuous access conditions. *Alcohol Clin Exp Res* 22:677-684.
- Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR (2003) Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2053-2058.
- Roberto M, Nelson TE, Ur CL, Gruol DL (2002) Long-term potentiation in the rat hippocampus is reversibly depressed by chronic intermittent ethanol exposure. *J Neurophysiol* 87:2385-2397.
- Rodd ZA, McKinzie DL, Bell RL, McQueen VK, Murphy JM, Schoepp DD, McBride WJ (2006) The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY404039 reduces alcohol-seeking but not alcohol self-administration in alcohol-preferring (P) rats. *Behav Brain Res* 171:207-215.
- Rolls ET (2010) A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behav Brain Res* 215:180-196.
- Rose AK, Shaw SG, Prendergast MA, Little HJ (2010) The importance of glucocorticoids in alcohol dependence and neurotoxicity. *Alcohol Clin Exp Res* 34:2011-2018.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24:1850-1856.
- Rothbart SB, Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*.
- Rotili D, Mai A (2011) Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. *Genes Cancer* 2:663-679.
- Rowland LM, Astur RS, Jung RE, Bustillo JR, Lauriello J, Yeo RA (2005) Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology* 30:633-639.
- Rowland LM, Astur RS, Jung RE, Bustillo JR, Lauriello J, Yeo RA (2005) Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology* 30:633-639.
- Roybon L, Deierborg T, Brundin P, Li JY (2009) Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:232-243.

S

- Saarelainen T, Pussinen R, Koponen E, Alhonen L, Wong G, Sirvio J, Castren E (2000) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. *Synapse* 38:102-104.
- Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Famous KR, Chawla P, Vassoler FM, Overland RP, Xia E, Bass CE, Terwilliger EF, Pierce RC, Cha JH (2010) Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine. *J Neurosci* 30:11735-11744.
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25:1089-1094.

- Sakai R, Ukai W, Sohma H, Hashimoto E, Yamamoto M, Ikeda H, Saito T (2005) Attenuation of brain derived neurotrophic factor (BDNF) by ethanol and cytoprotective effect of exogenous BDNF against ethanol damage in neuronal cells. *J Neural Transm* 112:1005-1013.
- Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Shi G, Pandey SC (2012) Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 36:61-71.
- Sakuragi S, Tominaga-Yoshino K, Ogura A (2013) Involvement of TrkB- and p75(NTR)-signaling pathways in two contrasting forms of long-lasting synaptic plasticity. *Sci Rep* 3:3185.
- Salimov RM, Salimova NB (1993) The alcohol-deprivation effect in hybrid mice. *Drug Alcohol Depend* 32:187-191.
- Salomon L, Lanteri C, Glowinski J, Tassin JP (2006) Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7476-7481.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382-386.
- Sanchis-Segura C, Borchardt T, Vengeliene V, Zghoul T, Bachteler D, Gass P, Sprengel R, Spanagel R (2006) Involvement of the AMPA receptor GluR-C subunit in alcohol-seeking behavior and relapse. *J Neurosci* 26:1231-1238.
- Sanchis-Segura C, Lopez-Atalaya JP, Barco A (2009) Selective boosting of transcriptional and behavioral responses to drugs of abuse by histone deacetylase inhibition. *Neuropsychopharmacology* 34:2642-2654.
- Sanna E, Talani G, Busonero F, Pisu MG, Purdy RH, Serra M, Biggio G (2004) Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *J Neurosci* 24:6521-6530.
- Sanna PP, Simpson C, Lutjens R, Koob G (2002) ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal. *Brain Res* 948:186-191.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419:407-411.
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925-935.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17501-17506.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004) Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237-248.
- Schlumm F, Mauceri D, Freitag HE, Bading H (2013) Nuclear calcium signaling regulates nuclear export of a subset of class IIa histone deacetylases following synaptic activity. *J Biol Chem* 288:8074-8084.
- Schmitt U, Waldhofer S, Weigelt T, Hiemke C (2002) Free-choice ethanol consumption under the influence of GABAergic drugs in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 26:457-462.
- Sengupta N, Seto E (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem* 93:57-67.
- Serra S, Brunetti G, Vacca G, Lobina C, Carai MA, Gessa GL, Colombo G (2003) Stable preference for high ethanol concentrations after ethanol deprivation in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Alcohol* 29:101-108.
- Shapiro ML, Tanila H, Eichenbaum H (1997) Cues that hippocampal place cells encode: dynamic and hierarchical representation of local and distal stimuli. *Hippocampus* 7:624-642.
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450:908-912.

- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941-953.
- Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem* 13:307-315.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Silvers JM, Tokunaga S, Mittleman G, Matthews DB (2003) Chronic intermittent injections of high-dose ethanol during adolescence produce metabolic, hypnotic, and cognitive tolerance in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1606-1612.
- Sisti HM, Glass AL, Shors TJ (2007) Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons. *Learn Mem* 14:368-375.
- Smothers CT, Jin C, Woodward JJ (2013) Deletion of the N-terminal domain alters the ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in a subunit-dependent manner. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1882-1890.
- Smothers CT, Woodward JJ (2006) Effects of amino acid substitutions in transmembrane domains of the NR1 subunit on the ethanol inhibition of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 30:523-530.
- Soares-Simi SL, Pastrello DM, Ferreira ZS, Yonamine M, Marcourakis T, Scavone C, Camarini R (2014) Changes in CREB activation in the prefrontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. *Front Integr Neurosci* 7:94.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219-1227.
- Spanagel R, Holter SM, Allingham K, Landgraf R, Zieglansberger W (1996) Acamprosate and alcohol: I. Effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *Eur J Pharmacol* 305:39-44.
- Spanos M, Besheer J, Hodge CW (2012) Increased sensitivity to alcohol induced changes in ERK Map kinase phosphorylation and memory disruption in adolescent as compared to adult C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 230:158-166.
- Stragier E, Massart R, Salery M, Hamon M, Geny D, Martin V, Boule F, Lanfumey L (2014) Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Mol Psychiatry*.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.
- Sullivan EV, Pfefferbaum A (2009) Neuroimaging of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol* 44:155-165.
- Sullivan EV, Rosenbloom MJ, Lim KO, Pfefferbaum A (2000) Longitudinal changes in cognition, gait, and balance in abstinent and relapsed alcoholic men: relationships to changes in brain structure. *Neuropsychology* 14:178-188.
- Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, Gan L (2009) Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 5:624-633.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9:465-476.
- Svotelis A, Gevry N, Gaudreau L (2009) Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 87:179-188.

T

- Takehara-Nishiuchi K (2014) Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Re*. Mar 16. pii: S0168-0102(14)00038-8. doi: 10.1016/j.neures.2014.02.012. [Epub ahead of print]
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Digneon P, Arancibia S, Beauge F (2001) Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *J Neurosci Res* 63:200-208.

- Taqi MM, Bazov I, Watanabe H, Sheedy D, Harper C, Alkass K, Druid H, Wentzel P, Nyberg F, Yakovleva T, Bakalkin G (2011) Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: elevated methylation in the brain of human alcoholics. *Addict Biol* 16:499-509.
- Tassin JP (2008) Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* 75:85-97.
- Tateno M, Ukai W, Yamamoto M, Hashimoto E, Ikeda H, Saito T (2005) The effect of ethanol on cell fate determination of neural stem cells. *Alcohol Clin Exp Res* 29:225S-229S.
- Taty-Taty GC, Courilleau C, Quaranta M, Carayon A, Chailleux C, Aymard F, Trouche D, Canitrot Y (2014) H2A.Z depletion impairs proliferation and viability but not DNA double-strand breaks repair in human immortalized and tumoral cell lines. *Cell Cycle* 13:399-407.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25:5455-5463.
- Tesone-Coelho C, Varela P, Escosteguy-Neto JC, Cavarsan CF, Mello LE, Santos-Junior JG (2013) Effects of ethanol on hippocampal neurogenesis depend on the conditioned appetitive response. *Addict Biol* 18:774-785.
- Thinschmidt JS, Walker DW, King MA (2003) Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. *Synapse* 48:189-197.
- Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, Lipsky RH (2009) Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J Neurochem* 109:1375-1388.
- Tokuda K, Izumi Y, Zorumski CF (2011) Ethanol enhances neurosteroidogenesis in hippocampal pyramidal neurons by paradoxical NMDA receptor activation. *J Neurosci* 31:9905-9909.
- Tongiorgi E (2008) Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res* 61:335-346.
- Tordoff MG, Bachmanov AA (2003) Influence of the number of alcohol and water bottles on murine alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 27:600-606.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-815.
- Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37:402-411.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5919-5924.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:355-367.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12:227-462.

V

- Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA (1998) Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* 111 (Pt 23):3497-3506.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vendruscolo LF, Gueye AB, Vendruscolo JC, Clemens KJ, Mormede P, Darnaudery M, Cador M (2010) Reduced alcohol drinking in adult rats exposed to sucrose during adolescence. *Neuropharmacology* 59:388-394.
- Vengeliene V, Bachteler D, Danysz W, Spanagel R (2005) The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: a pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. *Neuropharmacology* 48:822-829.

- Verdone L, Caserta M, Di Mauro E (2005) Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* 83:344-353.
- Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C (2007) Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement. *J Neurosci* 27:12700-12706.
- Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP (1992) Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 49:876-880.
- von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345:1-19.

W

- Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41:10-13.
- Waller MB, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1982) Induction of dependence on ethanol by free-choice drinking in alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 16:501-507.
- Wand GS, Dobs AS (1991) Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1290-1295.
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293:853-857.
- Wang Y, Cui H, Wang W, Zhao B, Lai J (2012) The region-specific activation of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II and extracellular signal-regulated kinases in hippocampus following chronic alcohol exposure. *Brain Res Bull* 89:191-196.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* 306:279-283.
- Werner DF, Swihart AR, Ferguson C, Lariviere WR, Harrison NL, Homanics GE (2009) Alcohol-induced tolerance and physical dependence in mice with ethanol insensitive alpha1 GABA A receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 33:289-299.
- Whissell PD, Eng D, Lecker I, Martin LJ, Wang DS, Orser BA (2013) Acutely increasing deltaGABA(A) receptor activity impairs memory and inhibits synaptic plasticity in the hippocampus. *Front Neural Circuits* 7:146.
- Whittemore ER, Yang W, Drewe JA, Woodward RM (1996) Pharmacology of the human gamma-aminobutyric acidA receptor alpha 4 subunit expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 50:1364-1375.
- Williams RJ, Berry LJ, Beerstecher E (1949) Individual Metabolic Patterns, Alcoholism, Genetotrophic Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 35:265-271.
- Wills TA, Klug JR, Silberman Y, Baucum AJ, Weitlauf C, Colbran RJ, Delpire E, Winder DG (2012) GluN2B subunit deletion reveals key role in acute and chronic ethanol sensitivity of glutamate synapses in bed nucleus of the stria terminalis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E278-287.
- Wills TA, Winder DG (2013) Ethanol effects on N-methyl-D-aspartate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a012161.
- Wilson GT (1988) Alcohol and anxiety. *Behav Res Ther* 26:369-381.
- Winocur G, Becker S, Luu P, Rosenzweig S, Wojtowicz JM (2012) Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. *Behav Brain Res* 227:464-469.
- Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G (2006) A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* 16:329-343.
- Wolffgramm J, Heyne A (1995) From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res* 70:77-94.
- Wolstenholme JT, Warner JA, Capparuccini MI, Archer KJ, Shelton KL, Miles MF (2011) Genomic analysis of individual differences in ethanol drinking: evidence for non-genetic factors in C57BL/6 mice. *PLoS One* 6:e21100.

X

- Xu X, Kozikowski AP, Pozzo-Miller L (2014) A selective histone deacetylase-6 inhibitor improves BDNF trafficking in hippocampal neurons from Mecp2 knockout mice: implications for Rett syndrome. *Front Cell Neurosci* 8:68.

Y

- Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y (2007) PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell* 25:801-812.
- Yang J, Harte-Hargrove LC, Siao CJ, Marinic T, Clarke R, Ma Q, Jing D, Lafrancois JJ, Bath KG, Mark W, Ballon D, Lee FS, Scharfman HE, Hempstead BL (2014) proBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Rep*.
- Yang X, Oswald L, Wand G (2003) The cyclic AMP/protein kinase A signal transduction pathway modulates tolerance to sedative and hypothermic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1220-1225.
- Yang XJ (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26:1076-1087.
- Yang XJ, Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26:5310-5318.
- Yim HJ, Gonzales RA (2000) Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition. *Alcohol* 22:107-115.
- Yin S, Niswender CM (2014) Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell Signal* May 2. pii: S0898-6568(14)00157-0. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.04.022. [Epub ahead of print].
- Yoshimoto K, Komura S (1989) Genetic differences in the effects of voluntary ethanol consumption on brain monoamine levels in inbred strains of mice, C57BL/6J, C3H/He and DBA/2Cr. *Alcohol* 24:225-229.
- Yu IT, Park JY, Kim SH, Lee JS, Kim YS, Son H (2009) Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology* 56:473-480.

Z

- Zapata A, Gonzales RA, Shippenberg TS (2006) Repeated ethanol intoxication induces behavioral sensitization in the absence of a sensitized accumbens dopamine response in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Neuropsychopharmacology* 31:396-405.
- Zegerman P, Canas B, Pappin D, Kouzarides T (2002) Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* 277:11621-11624.
- Zhang H, Sakharkar AJ, Shi G, Ugale R, Prakash A, Pandey SC (2010) Neuropeptide Y signaling in the central nucleus of amygdala regulates alcohol-drinking and anxiety-like behaviors of alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 34:451-461.
- Zhang L, Dhillon HS, Barron S, Hicks RR, Prasad RM, Seroogy KB (2000) Effects of chronic ethanol administration on expression of BDNF and trkB mRNAs in rat hippocampus after experimental brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 79:174-179.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.

- Zhao M, Li D, Shimazu K, Zhou YX, Lu B, Deng CX (2007) Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry* 62:381-390.
- Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao WN, Ho HY, Schmidt L, Chen WG, Lin Y, Savner E, Griffith EC, Hu L, Steen JA, Weitz CJ, Greenberg ME (2006) Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52:255-269.
- Zhou Z, Yuan Q, Mash DC, Goldman D (2011) Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6626-6631.
- Zorumski CF, Mennerick S, Izumi Y (2014) Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol* 48:1-17.
- Zucca S, Valenzuela CF (2010) Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 30:6776-6781.