



HAL
open science

Etude des mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du PACAP exogène et endogène sur le cerveau d'animaux exposés à l'alcool dans le modèle de syndrome d'alcoolisme foetal(SAF)

Ilhem Shili

► **To cite this version:**

Ilhem Shili. Etude des mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du PACAP exogène et endogène sur le cerveau d'animaux exposés à l'alcool dans le modèle de syndrome d'alcoolisme foetal(SAF). Sciences agricoles. Normandie Université; Université de Tunis El Manar, 2020. Français. NNT : 2020NORMR061 . tel-03494308

HAL Id: tel-03494308

<https://theses.hal.science/tel-03494308>

Submitted on 19 Dec 2021

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.



Normandie Université

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie
et de l'Université de Tunis El Manar

Etude des mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du PACAP exogène et endogène sur le cerveau d'animaux exposés à l'alcool dans un modèle de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF)

Présentée et soutenue par
Ilhem SHILI

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2020
devant le jury composé de

M. Vincent LELIEVRE	Professeur à l'Université de Strasbourg, France	Rapporteur
Mme Olfa TEBOURBI	Professeure à l'Université de Carthage, Bizerte, Tunisie	Rapporteur
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche à l'Université de Rouen, Normandie, France	Examineur
M. Sami ZEKRI	Professeur à l'Université Tunis El Manar, Tunisie	Examineur
Mme Olfa MASMOUDI KOUKI	Professeure à l'Université Tunis El Manar, Tunisie	Codirecteur de thèse
M. David VAUDRY	Chargé de Recherche à l'Université de Rouen, Normandie, France	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Dr. David VAUDRY, unité INSERM 1239 et Pr. Olfa MASMOUDI KOUKI
unité LR 18 ES03



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement





Normandie Université

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie
et de l'Université de Tunis El Manar

Etude des mécanismes impliqués dans les effets protecteurs du PACAP exogène et endogène sur le cerveau d'animaux exposés à l'alcool dans un modèle de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF)

Présentée et soutenue par
Ilhem SHILI

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2020
devant le jury composé de

M. Vincent LELIEVRE	Professeur à l'Université de Strasbourg, France	Rapporteur
Mme Olfa TEBOURBI	Professeure à l'Université de Carthage, Bizerte, Tunisie	Rapporteur
M. Bruno GONZALEZ	Directeur de Recherche à l'Université de Rouen, Normandie, France	Examinateur
M. Sami ZEKRI	Professeur à l'Université Tunis El Manar, Tunisie	Examinateur
Mme Olfa MASMOUDI KOUKI	Professeure à l'Université Tunis El Manar, Tunisie	Codirecteur de thèse
M. David VAUDRY	Chargé de Recherche à l'Université de Rouen, Normandie, France	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Dr. David VAUDRY, unité INSERM 1239 et Pr. Olfa MASMOUDI KOUKI
unité LR 18 ES03

Remerciements

*Le présent travail a fait l'objet d'une cotutelle de thèse de doctorat sous les directions du **Dr. David VAUDRY** du Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine de l'Université de Rouen, Normandie (France), et du **Pr. Olfa MASMOUDI-KOUKI**, du Laboratoire de Neurophysiologie, Physiopathologie Cellulaire et Valorisation des biomolécules, de l'université de Tunis El Manar (Tunisie).*

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du Jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger mon travail :

*Le **Pr. Vincent Lelièvre**, Professeur à l'Université de Strasbourg, me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail et d'avoir accordé du temps à la correction de ce manuscrit.*

*Le **Pr. Olfa Tebourbi**, Professeure à l'Université de Bizerte de Tunis, a accepté la charge d'être rapporteur de ce travail. Je la remercie sincèrement pour l'intérêt qu'elle témoigne ainsi à nos recherches.*

*Le **Dr. Bruno Gonzalez**, Directeur de Recherche à l'Université de Rouen Normandie, a eu la gentillesse d'accepter de participer à ce jury. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'évaluation de ce manuscrit.*

*Le **Pr. Sami Zekri**, Professeur à l'Université des Sciences de Tunis, a accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.*

*Je souhaite remercier le **Dr. Youssef Anouar**, Directeur de l'Unité Inserm 1239, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir mis à disposition les moyens nécessaires au déroulement de ces travaux de thèse.*

*Je remercie le **Pr. Olfa MASMOUDI-KOUKI**, Professeure à l'Université de Tunis El Manar de m'avoir encadrée tout le long de ma thèse. Merci pour la confiance que tu m'as donnée dans ce projet, et qui m'a beaucoup apporté. J'ai énormément appris grâce à toi et je te remercie pour le soutien dont tu as toujours fait preuve, ce qui m'a permis d'améliorer mes réflexions et ma passion pour la recherche scientifique. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi toutes ces années et je pense que tu m'as beaucoup apporté. Sois assurée de mon attachement et de ma profonde gratitude.*

*Je remercie le **Dr. David Vaudry**, Chargé de Recherche à l'Inserm, de m'avoir intégrée au sein de son équipe et de m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. Je le remercie pour m'avoir fait confiance et laissé des libertés d'initiative tout au long de ces quatre années de travail en commun. Tu m'as toujours assuré la possibilité de travailler dans les meilleures conditions. Nos rapports ont évolué au cours de mon doctorat et je peux dire aujourd'hui que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme directeur de thèse. Au cours de ces dernières années, tu étais impliqué dans l'orientation de mes travaux et je t'en suis infiniment reconnaissante. Merci pour ta bonne humeur, ta patience et tes corrections, je crois qu'on peut dire que tu m'as réappris à écrire... Ce n'était pas chose facile... Tu as eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel. Je suis heureuse que tu fasses ainsi parti aujourd'hui des personnes qui ont marqué ma vie.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du service de ressources biologiques de l'Université de Rouen, notamment le **Dr. Arnaud Arabo** et **Julie Maucotel** pour leur disponibilité. Merci à **David Godefroy** pour son aide technique et sa grande disponibilité. Merci au **Dr. Martine Dubois** pour son aide et son écoute lors de la rédaction de ma saisine. Qu'ils trouvent tous ici le témoignage de ma considération distinguée.*

*Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 2. **Magali**, merci pour toutes les relectures indispensables de ce manuscrit, pour ton aide à chercher les produits au moment des manips, merci d'être souvent à l'écoute, tout simplement tu es la maman de l'équipe. **Benjamin**, je suis très reconnaissante pour ta gentillesse. **Marjo**, merci pour ton humour, tu as su mettre une bonne ambiance. Enfin je remercie l'ensemble des membres de l'unité INSERM1239. J'adresse aussi mes sincères remerciements à **Catherine** pour son immense gentillesse.*

*Par la même occasion, j'adresse mes sincères remerciements à mes collègues de travail, soit **Michael**, **Quentin** et **Martin**, pour leur soutien amical.*

À mes chers amis,

*La folle **Marine**, la douce **Mariem**, **Karima**, **Nicolas**, **Hamadi**, et **Moez** merci d'être toujours là pour moi, nous avons vécu des moments inoubliables. Je vous remercie sincèrement de votre amitié fidèle au cours de ces années.*

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille :

À mes sœurs,

Vous m'avez aussi grandement soutenue et je vous en suis très reconnaissante. Merci d'avoir supporté mes doutes, mes états d'âme et d'avoir toujours été là pour moi. Je vous aime sœurs.

À mon très cher père,

Grâce à toi papa, j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

À ma Mamino d'amour,

À ma maman qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes seulement. Ces années de thèse n'ont pas dû être facile pour toi non plus, mais ton amour me porte et me guide tous les jours. Tu as toujours cru en moi, même quand le moral et la confiance était au plus bas. Finalement j'y suis arrivée et c'est aussi grandement grâce à toi qui a vécu cette thèse en même temps que moi. Merci Mama pour tous les instants magiques qui m'ont fait retrouver le sourire dans les moments difficiles. Pour ton écoute, pour m'avoir supportée tout simplement. Je t'aime.

Un clin d'œil à toutes les personnes et événements qui ont croisé ma route et qui ont tenté de me décourager, vous m'avez aidé plus que vous ne le pensez, pour ça, je vous remercie.

Abstract

Maternal alcohol consumption during pregnancy can cause serious birth defects leading to fetal alcohol syndrome (FAS). FAS is characterized among others by irreversible craniofacial abnormalities and atrophy of the developing brain, and leads to persistent functional deficits at adulthood. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) exerts neurotrophic and neuroprotective properties in several cellular and animal models. As PACAP and its receptors are already present in the developing brain it suggests that this peptide could be protective in a model of prenatal ethanol exposure.

Thus, the first part of this work consisted in evaluating the protective effect of endogenous and exogenous PACAP in a FAS model. Animal monitoring indicated that PACAP injections significantly reduced mortality and abortion rate in alcoholic pregnant mice. Morphological evaluation showed that embryos exposed *in utero* to daily ethanol injections had reduced body and brain size, and that this effect was partially blocked by intrauterine injections of PACAP. In the cerebral cortex, ethanol decreased the number of neurons, of activated glial cells and of disorganized blood vessels. This implies a very strong decrease in the expression of trophic factors, an increase in the level of oxygen species level and an activation of key apoptotic factors. Co-treatment of animals exposed to alcohol with PACAP partially reduced the atrophy of E18 embryos. While PACAP only reduced the thinning of the brain cortical layers, it blocked glial reactivity and protected micro-vessels disorganization induced by ethanol. This may come from the ability of PACAP to promote the expression of neurotrophic factors such as GDNF, FGF or VEGFa, to stop the oxidation of cellular constituents and to block the apoptotic cascade. We have also observed that ethanol very strongly repressed the expression of the PACAPergic system during embryonic development. Our hypothesis is that ethanol acts through activation of transcription factors such as Sp1. This strong decrease in the expression of PACAP, VIP and their 3 receptors could also explain part of the toxic effects of ethanol since brains from PACAP KO animals are less resistant than those from wild type animals. In addition, the injection of PACAP to alcoholic animals restored the expression of all the transcripts of the PACAPergic system excepted the one of VPAC1. These results probably explain the powerful antioxidant and antiapoptotic action of PACAP and its lack of effect on the inflammatory response.

The second part of my work investigated the beneficial effects at adulthood of these PACAP treatments in our FAS model. Results show that brain cells from P30 animals exposed to ethanol and treated with PACAP during the embryonic period exhibit resistance to

further stress compared to cells from animals only exposed to alcohol. This is accompanied by an inhibition of the high levels of oxidative stress found in the brains of animals exposed *in utero* to ethanol. At adulthood, these mice having suffered from prenatal ethanol exposure appear anxious and exhibit locomotor disorders which are significantly reduced in PACAP co-treated animals.

Altogether, these data show that PACAP could be a biomarker for the detection of children with FAS and/or a powerful therapeutic agent to limit victims of prenatal ethanol exposure further developmental brain alterations, as well as of the secondary lesions observed in case of a new stress of the neurons at adulthood.

Résumé étendu

L'exposition à l'alcool pendant la vie embryonnaire peut provoquer un retard de croissance, des malformations congénitales, une dysmorphie crânio-faciale et/ou des lésions cérébrales, qui se traduisent à l'âge adulte par des déficits cognitifs et comportementaux. Ces déficiences irréversibles causées par une consommation excessive d'alcool pendant la grossesse conduisent à ce que l'on appelle communément le syndrome d'alcoolisation fœtale ou SAF.

Le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), est un neuropeptide découvert initialement pour sa capacité à stimuler la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans des cellules hypophysaires de rat en culture. Impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques, ce neuropeptide exerce son action *via* l'activation de trois récepteurs couplés aux protéines G dénommés respectivement PAC1, VPAC1 et VPAC2. Le PACAP est doté de multiples actions physiologiques aussi bien sur le système nerveux central que sur les systèmes respiratoire, cardiovasculaire, digestif, immunitaire, reproducteur, etc. Le PACAP est principalement connu pour ses effets pro-différenciateurs et anti-apoptotiques sur divers types cellulaires de même que dans plusieurs modèles *in vitro et in vivo*. Ce peptide est également capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour ensuite aller au niveau du cerveau exercer ses propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices permettant le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de la survie des cellules nerveuses. Le PACAP agit en exerçant, entre autres, une action anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-apoptotique. Ce peptide apparaît donc comme un candidat prometteur pour le traitement de diverses atteintes cérébrales multifactorielles telles qu'une exposition prénatale à l'alcool. Néanmoins, la capacité du PACAP à enrayer les dommages provoqués par une exposition *in utero* à l'éthanol sur le développement cérébral n'avait jamais été investiguée auparavant.

La première partie de mon travail a consisté à évaluer l'effet protecteur du PACAP endogène et exogène dans un modèle de SAF. Pour cela, un modèle murin de SAF a été développé chez la souris gestante qui a reçu une injection quotidienne d'éthanol en intra-péritonéal (1,5 g/kg) pour exposer les fœtus à l'alcool du jour embryonnaire 7 (E7) au jour E18. En parallèle de cela, certains animaux ont aussi reçu des administrations intra-utérines quotidiennes de PACAP (5 µg/10 µl) de E9 à E18.

Un suivi des animaux indique que les injections de PACAP réduit fortement la mortalité et le taux d'avortement chez les animaux alcoolisés. Une évaluation morphologique montre

que les embryons exposés *in utero* à l'éthanol présentent une taille corporelle et cérébrale réduite et que cet effet est partiellement bloqué par des injections *intra-utérines* de PACAP. Au niveau cellulaire, on constate que l'éthanol diminue le nombre de neurones dans les couches corticales, rend les cellules gliales réactives et désorganise la structuration des vaisseaux. Ceci implique une diminution très forte de l'expression de facteurs trophiques comme le GDNF, le TGF, le VEGFa ou l'IGF, une forte augmentation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène et des marqueurs de stress oxydatif et une activation de facteurs clés de l'apoptose comme la caspase-3. Le co-traitement des animaux exposés à l'alcool avec du PACAP réduit partiellement l'atrophie des embryons à E18. Si le PACAP n'a qu'un effet partiel sur la diminution de l'épaisseur des couches corticales au niveau du cerveau, il réduit la réactivité gliale et protège les microvaisseaux de la désorganisation des microvaisseaux induites par une exposition à l'éthanol *in utero*. Ceci peut s'expliquer par la capacité du PACAP à promouvoir l'expression de certains facteurs neurotrophiques comme le GDNF, le FGF ou le VEGFa, à enrayer l'oxydation des constituants cellulaires comme les lipides, les protéines ou l'ADN, et à bloquer la cascade apoptotique en stimulant l'expression de Bcl-2 et en inhibant celle des caspases-9 et -3. Nous avons aussi observé que l'éthanol réprime très fortement l'expression du système PACAPergique durant le développement embryonnaire. Notre hypothèse est que l'éthanol inhibe l'expression du gène du PACAP *via* une action sur des facteurs de transcription tels que Sp1, présent sur le promoteur du PACAP. Cette très forte diminution de l'expression du PACAP, du VIP et de leurs 3 récepteurs pourrait aussi expliquer une partie des effets toxiques de l'éthanol puisque les expériences réalisées avec des animaux PACAP KO montrent que le PACAP endogène exerce un effet neuroprotecteur très puissant chez les animaux exposés à l'alcool (1 g/kg d'éthanol quotidiennement de E7 à E18) *in utero*. De plus, l'injection de PACAP aux animaux alcoolisés restaure l'expression de tous les transcrits du système PACAPergique à l'exception du VPAC1. Ces résultats expliquent probablement l'effet anti-oxydant et anti-apoptotique très puissant du PACAP et son absence d'effet sur les acteurs de la réponse inflammatoire.

La seconde partie de mon travail a consisté à étudier les effets bénéfiques à l'âge adulte de ces traitements au PACAP dans notre modèle de SAF. Les résultats montrent que les cellules du cerveau d'animaux P30 exposés à l'éthanol et traités au PACAP pendant la période embryonnaire présentent une résistance en cas de nouveau stress à l'âge adulte comparées aux cellules d'animaux seulement exposés à l'alcool. Ceci s'accompagne d'une inhibition des niveaux élevés de stress oxydatifs que l'on retrouve dans le cerveau des animaux exposés *in utero* à l'éthanol. De plus, à l'âge adulte, ces souris ayant souffert d'une

exposition prénatale à l'éthanol apparaissent anxieuses et présentent des troubles locomoteurs qui se trouvent significativement réduits lorsque les animaux ont également reçu du PACAP.

L'ensemble de ces données, concernant les effets du PACAP dans un modèle de SAF, montre que ce peptide pourrait être un biomarqueur pour détecter les enfants atteints de SAF et/ou un agent thérapeutique puissant pour limiter les altérations développementales du cerveau ainsi que les lésions secondaires observées en cas de nouvelle agression des neurones, chez les personnes victimes d'une exposition prénatale à l'alcool.

Sommaire

Abstract.....	7
Résumé étendu	9
Liste des abréviations	17
Liste des figures	21
Liste des tableaux	23
INTRODUCTION.....	25
EMBRYOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX.....	27
1. Morphogenèse cérébrale.....	29
1.1. Gastrulation.....	29
1.2. Neurulation	31
1.3. Organogenèse.....	33
1.4. Neurogenèse et rôle de la glie radiaire	34
2. Système vasculaire cérébral.....	37
2.1. Vasculogenèse.....	37
2.2. Angiogenèse.....	37
ETHANOL ET SYNDROME	41
D'ALCOOLISATION.....	41
FETALE (SAF).....	41
1. Pharmacocinétique de l'éthanol	43
1.1. Absorption, distribution et élimination.....	43
1.2. Métabolisme.....	45
1.2.1. Voie oxydative	45
1.2.2. Voie non oxydative	47
2. Mécanismes de défense oxydative	47
2.1. Les dommages oxydatifs	48
2.2. Effets de l'éthanol sur le système antioxydant.....	49

2.2.1.	Oxydation des lipides	51
2.2.2.	Oxydation des protéines	52
2.2.3.	Oxydation de l'ADN	52
2.3.	Systèmes antioxydants.....	53
2.3.1.	Systèmes enzymatiques	53
2.3.2.	Systèmes non-enzymatiques	55
3.	Conséquences à court terme d'une exposition prénatale à l'éthanol	56
3.1.	Effets sur le placenta	56
3.2.	Le syndrome d'alcoolisation fœtale	57
3.2.1.	Epidémiologie	57
3.2.2.	Caractéristiques du syndrome d'alcoolisation fœtale	58
3.3.	Effets sur le développement cérébral	60
4.	Impacts à long terme d'une exposition prénatale à l'éthanol	64
4.1.	Altérations persistantes du système nerveux	64
4.2.	Vulnérabilité en cas de nouvelles agressions du cerveau	66
PITUITARY ADENYLATE CYCLASE-ACTIVATING POLYPEPTIDE (PACAP).....		68
1.	Découverte	70
2.	Description du peptide.....	70
2.1.	Structure du peptide.....	70
2.2.	Evolution phylogénétique	71
2.3.	Biosynthèse du PACAP.....	72
2.4.	Libération et dégradation du PACAP	74
3.	Distribution du PACAP	75
3.1.	Dans les organes périphériques.....	75
3.2.	Dans le placenta	75
3.3.	Au niveau de la BHE.....	76
3.4.	Dans le système nerveux central.....	77

3.4.1.	Distribution du PACAP dans le SNC chez l'adulte.....	77
3.4.2.	Distribution du PACAP dans le SNC au cours de l'ontogenèse.....	78
4.	Les Récepteurs du PACAP	79
4.1.	Les récepteurs PAC1	79
4.2.	Les récepteurs VPAC1/VPAC2.....	82
4.3.	Caractérisation pharmacologique des récepteurs du PACAP.....	82
5.	Distribution des récepteurs du PACAP	83
5.1.	Dans les organes périphériques à l'âge adulte	84
5.2.	Dans le placenta	84
5.3.	Dans le SNC adulte	86
5.4.	Ontogenèse des récepteurs du PACAP.....	86
6.	Activités biologiques du PACAP.....	87
6.1.	Effet du PACAP sur le développement embryonnaire extracérébral.....	87
6.2.	Rôle du PACAP dans le développement du SNC.....	89
6.2.1.	Effets du PACAP sur l'angiogenèse	89
6.2.2.	Effets du PACAP sur la prolifération des neurones.....	89
6.2.3.	Effets du PACAP sur la migration des neurones	90
6.2.4.	Effets du PACAP sur la différenciation des neurones	91
6.2.5.	Effet du PACAP sur la survie des neurones	92
6.3.	Effets neuroprotecteurs du PACAP à l'âge adulte.....	93
6.3.1.	Mécanismes des effets neuroprotecteurs du PACAP.....	94
6.3.2.	Effets du PACAP sur la neuro-inflammation	95
6.4.	Effets du PACAP sur le comportement.....	96
6.4.1.	Impact des effets du PACAP sur le comportement au cours du développement.....	96
6.4.2.	Effets du PACAP sur le comportement à l'âge adulte.....	96
	OBJECTIF	98
	MATERIELS ET METHODES.....	102

RESULTATS	113
DISCUSSION	210
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	222
REFERENCES.....	228

Liste des abréviations

AC	Adénylyl-cyclase
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNP	<i>Activity-dependent neurotrophic protein</i>
ALDH	Acétaldéhyde déshydrogénase
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Acide aspartique
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CGE	Couche granulaire externe
CGI	Couche granulaire interne
CMol	Couche moléculaire
CP	Carboxypeptidase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CYP	Cytochrome P450
DAG	Diacylglycérol
DBE	Dibenzyléther
DCM	Dichlorométhane
DPP-IV	Dipeptidyl peptidase-IV
Ex	Stade embryonnaire x
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPAC	<i>Exchange protein activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
Epi	Epiblaste
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GDNF	<i>Glial cell derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GPx	Glutathion peroxydase
GRF	<i>Growth hormone-releasing factor</i>
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
<i>HB-EGF</i>	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
His	Histidine
HRP	Hématome rétro-placentaire
4-HNE	4-Hydroxynonanal
IC3	Troisième boucle intracellulaire
ICV	Intra cérébroventriculaire
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>

IL	Interleukine
Ile	Isoleucine
IP ₃	Inositol trisphosphate
IP	Intra-péritonéal
IU	Intra-utérine
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharides
Lys	Lysine
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCAO	Occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne
MDA	Malondialdéhyde
MCI	Masse cellulaire interne
MPP ⁺	1-méthyl-4-phényl pyridinium
NaCl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NT	Neurotrophine
O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Radical superoxyde
Px	Jour postnatal x
PAC1	Récepteur spécifique du PACAP
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PACAP27/38	Forme de 27 ou 38 acides aminés du PACAP
PAM	<i>Peptidyl glycine α-amidating monooxygenase</i>
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Prohormones convertases
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldéhyde
Phe	Phénylalanine
PKA/C	Protéine kinase A/C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLGF	<i>Placental growth factor</i>
PRP	<i>PACAP-related peptide</i>
PTS-6	<i>Peptide transport system-6</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAF	Syndrome d'alcoolisation fœtale
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Sérine
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD	Superoxyde dismutase
SVZ	Zone sous-ventriculaire
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>

Thr	Thréonine
TM	Domaine transmembranaire
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
TPA	<i>12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
Tyr	Tyrosine
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	Récepteur du VEGF
VIP	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>
VPACs	Récepteurs de type 1 et 2 du PACAP et du VIP
VPAC1	Récepteur de type 1 du PACAP et du VIP
VPAC2	Récepteur de type 2 du PACAP et du VIP
ZV	Zone ventriculaire

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de la gastrulation chez la souris.	30
Figure 2 : Neurulation ou formation du tube neural lors du développement embryonnaire.	32
Figure 3 : Représentation des grandes structures du cerveau.	33
Figure 4: Etapes de l'angiogenèse cérébrale au cours du développement embryonnaire chez la souris.	38
Figure 5 : Trajet de l'éthanol dans l'organisme du corps humain.	44
Figure 6 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol.	50
Figure 7 : Dommages oxydatifs induits par le métabolisme de l'éthanol.	54
Figure 8 : Prévalence globale du SAF dans différentes populations rapportée à 10000 personnes	58
Figure 9 : Représentation schématique du précurseur du neuropeptide PACAP et de sa maturation post-traductionnelle.	73
Figure 10 : Passage du PACAP à travers la BHE.	77
Figure 11 : Voies de transduction activées par les récepteurs du pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP).	80
Figure 12 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole d'injection chez les souris gestantes de E7 jusqu'au sacrifice des animaux à E18 ou P30.	104
Figure 13 : Méthode d'injection intra-utérine chez la souris gestante.	105
Figure 14 : Diffusion de l'encre de Chine jaune dans la vascularisation fœtale.	106
Figure 15 : Étapes de clearing de cerveau d'embryon au dix-huitième jour embryonnaire (E18).	108
Figure 16 : Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze).....	110
Figure 17 : Test de la planche à trous (Hole-Boardtest)	111
Figure 18 : Test de boîte claire/obscur (Light/Dark Box)	111
Figure 19 : Schémas récapitulant le mécanisme de délétion du système PACAPergique par l'éthanol via le facteur de transcription Sp1.	218

Liste des tableaux

Tableau 1: Expression de certaines classes d'ALDH dans le cerveau de l'Homme, du rat et de la souris.	47
Tableau 2 : Effets de l'éthanol sur le développement du SN embryonnaire tout le long des trois trimestres de gestation chez la souris.....	60
Tableau 3 : Effets de l'éthanol <i>in utero</i> à long-terme sur le développement du SN.	65
Tableau 4 : Principaux outils pharmacologiques disponibles pour étudier l'implication fonctionnelle des récepteurs PAC1, VPAC1, VPAC2.....	83
Tableau 5 : Localisation et abondance relative du neuropeptide PACAP et de ses récepteurs dans différents organes périphériques.....	85

INTRODUCTION

EMBRYOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX

1. Morphogenèse cérébrale

1.1. Gastrulation

Au stade embryonnaire (E) E3,5, une fente se constitue dans la masse cellulaire, qui sera à l'origine du blastocoele. Le blastocoele est une cavité remplie de liquide qui se forme à l'intérieur de l'embryon. Il résulte de la segmentation (les mitoses successives créant un espace) et de la production de liquide par les cellules. L'embryon devient alors un blastocyste (Rivera-Pérez and Hadjantonakis, 2014; Snow, 1977).

Vers E4,5, l'embryon adhère à l'épithélium utérin. À ce stade, l'embryon est constitué de deux types de cellules : des cellules totipotentes qui constituent la masse cellulaire interne (MCI) (Rivera-Pérez and Hadjantonakis, 2014; Snow, 1977) et le reste des cellules qui forme une couche monocellulaire enveloppant tout l'embryon appelée trophoctoderme (Kerszberg and Wolpert, 2007; Rivera-Pérez and Hadjantonakis, 2014; Snow, 1977). Une partie du trophoblaste participera à la formation d'une portion du placenta embryonnaire pendant que l'autre donnera naissance à l'embryon. La distinction de ces deux parties suite à la segmentation est une caractéristique du développement embryonnaire des Mammifères (Kerszberg and Wolpert, 2007).

Entre E3,5 et E4,5 (Figure 1A), la MCI se divise en deux régions. D'une part, le feuillet de surface en contact avec le blastocoele devient l'endoderme primitif, qui participera à la constitution des annexes embryonnaires (vitellus, amnios et allantoïde). D'autre part, le reste de la MCI devient l'ectoderme primitif ou épiblaste, à l'origine des tissus embryonnaires. Tout ce qui entoure ces deux régions forme à partir du trophoblaste, le trophoctoderme polaire qui devient ensuite trophoctoderme mural.

À E4,5, l'implantation de l'embryon se fait dans la paroi de l'utérus. À E5,5, les cellules du trophoctoderme mural subissent des endomitoses pour donner naissance aux cellules géantes du trophoblaste qui envahissent l'utérus pendant l'implantation. Le trophoctoderme polaire en contact avec l'épiblaste (Epi) forme les tissus extra-embryonnaires, *i.e.*, le cône ectoplacentaire et l'ectoderme extra-embryonnaire (Figure 1B). Le cône ectoplacentaire est une structure caractéristique de l'embryon de souris, qui résulte de la fusion de certaines cellules du trophoctoderme polaire. Certaines cellules de l'endoderme primitif migrent pour couvrir complètement la surface interne du trophoctoderme mural et créer l'endoderme pariétal. Les cellules de l'endoderme primitif restantes forment l'endoderme viscéral (Figure 1B). L'épiblaste s'allonge et développe une cavité interne appelée la cavité pro-amniotique, à partir de laquelle se développera le futur embryon.

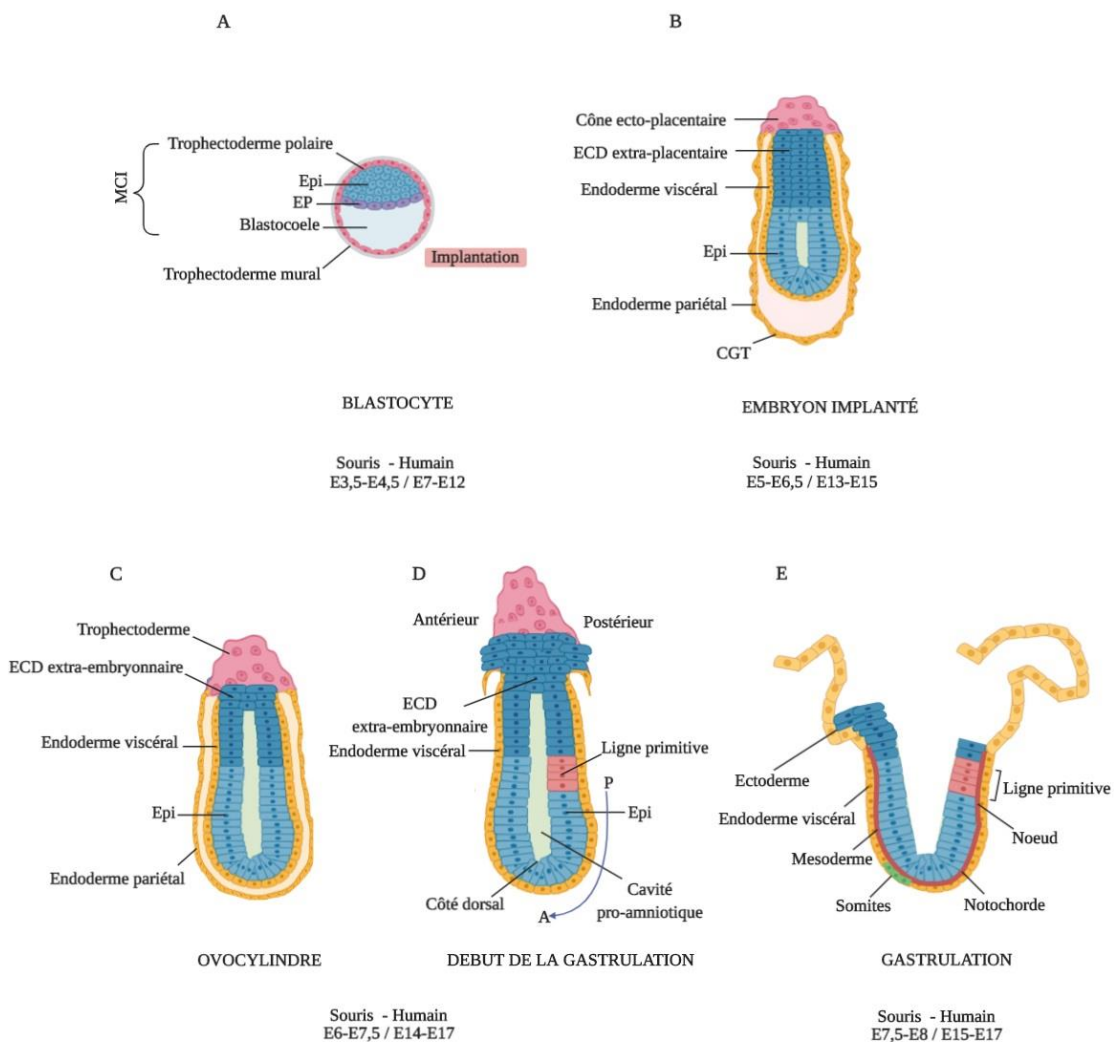


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de la gastrulation chez la souris.

Avant l'implantation, entre E3,5 et E4,5, la masse cellulaire interne (MCI) se divise en deux régions : l'épiblaste et l'endoderme primitif. Ces deux régions constituent le trophectoderme polaire. Les cellules recouvrant le blastocœle constituent le trophectoderme. B. Après l'implantation, les cellules du trophectoderme en contact avec l'épiblaste forment les tissus extra-embryonnaires et le cône ectoplacental ainsi que l'ectoderme extra-embryonnaire, qui sera à l'origine du placenta. Les cellules du trophectoderme mural deviennent les cellules géantes du trophoblaste. C. L'épiblaste s'allonge et développe une cavité interne en forme de U, appelée la cavité pro-amniotique. L'embryon prend une forme cylindre et est alors appelé « ovocylindre ». D. Le début de la gastrulation est marqué par l'apparition de la ligne primitive dans la partie postérieure de l'épiblaste. E. Le début de la gastrulation commence avec l'apparition de la ligne primitive dans la partie postérieure de l'embryon. F. Des cellules migrent *via* la ligne primitive, formant ainsi un nouveau feuillet : le mésoderme. Abréviations : CGT : cellules géantes du trophoblaste ; ECD : ectoderme ; Epi : épiblaste ; EP : endoderme primitif.

À E6 (Figure 1C), la structure cylindrique contenant à la fois l'épiblaste et les tissus extra-embryonnaires dérivant du trophectoderme polaire donne ce que l'on appelle l'ovocylindre.

Les premiers signes marquant le début de la gastrulation sont visibles à E6,5 avec l'apparition de la ligne primitive dans la région postérieure de l'embryon (Figure 1D). Cette ligne est initiée par un épaissement localisé de l'épiblaste ; c'est le futur pôle postérieur de l'embryon. Une condensation de cellules, forme le nœud qui devient discernable à l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Vers E7,5 (Figure 1E), les cellules épiblastiques convergent vers la ligne primitive. Ces cellules en prolifération migrent *via* la ligne primitive afin de se répandre latéralement et antérieurement entre l'ectoderme et l'endoderme viscéral, pour former un feuillet mésodermique (Kerszberg and Wolpert, 2007). La prolifération cellulaire se poursuit tout au long de la gastrulation et la région de l'embryon située antérieurement par rapport au nœud croît rapidement en taille (Wolpert, 1992). À E7, certaines cellules dérivées de l'épiblaste traversent le mésoderme et entrent dans l'endoderme viscéral. Elles remplacent progressivement ce dernier pour former l'endoderme embryonnaire définitif à l'extérieur du cylindre, qui constituera la partie ventrale de l'embryon (Kerszberg and Wolpert, 2007). Les cellules migrant antérieurement par rapport au nœud forment la notochorde (Figure 1E), tandis que les cellules mésodermiques de la région environnante migrent antérieurement pour former les somites. La prolifération cellulaire se poursuit tout au long de la gastrulation et la région de l'embryon située antérieurement par rapport au nœud croît rapidement en taille. Le nœud constitue finalement un centre de cellules souches qui donnera naissance à la queue. Tandis que la notochorde constitue l'axe médian de l'embryon et joue un rôle important dans la prochaine étape du développement neural.

1.2.Neurulation

La neurulation permet ensuite la formation du tube neural et de la crête neurale. Le tube neural va donner naissance au système nerveux central (SNC : cerveau et moelle épinière) et les crêtes neurales vont donner naissance au système nerveux périphérique (SNP : nerfs, ganglions, système sympathique et parasympathique). Vers le stade E8,5 le système nerveux (SN) s'individualise à partir de la région dorsale de l'ectoderme pour former la plaque neurale, sous l'influence des protéines issues du mésoderme (notochorde). Cette structure peut contenir jusqu'à 50% de l'ectoderme (Figure 2A). La formation de la plaque neurale nécessite une phase d'induction, au cours de laquelle les cellules du feuillet ectodermique de l'embryon reçoivent des signaux provenant des tissus adjacents, en particulier du mésoderme, puis elle se

poursuit sous l'action de mouvements morphogénétiques (Figure 2B). Les bords de la plaque neurale s'épaississent et s'élèvent pour former les plis neuraux nommés bourrelets neuraux, qui après fusion, forment le tube neural (Figure 2C). Ensuite, la plaque neurale s'incurve et une gouttière neurale en forme de U apparaît dans le centre de la plaque (Gordon, 2009)(Figure 2D). A l'intérieur du tube neural, les progéniteurs neuraux vont proliférer, se différencier et donner différents types cellulaires. Au moment de la fermeture du tube neural, certaines cellules se détachent des bourrelets latéraux et forment les cellules des crêtes neurales situées dans la partie dorsale du tube neural (Figure 2E)(Colas and Schoenwolf, 2001). La gastrulation et la neurulation sont achevées vers E9 (Figure 2F). Un processus de retournement complexe survient également à ce stade, au cours duquel l'embryon se retrouve replié sur sa partie ventrale alors qu'il était auparavant replié sur sa partie dorsale.

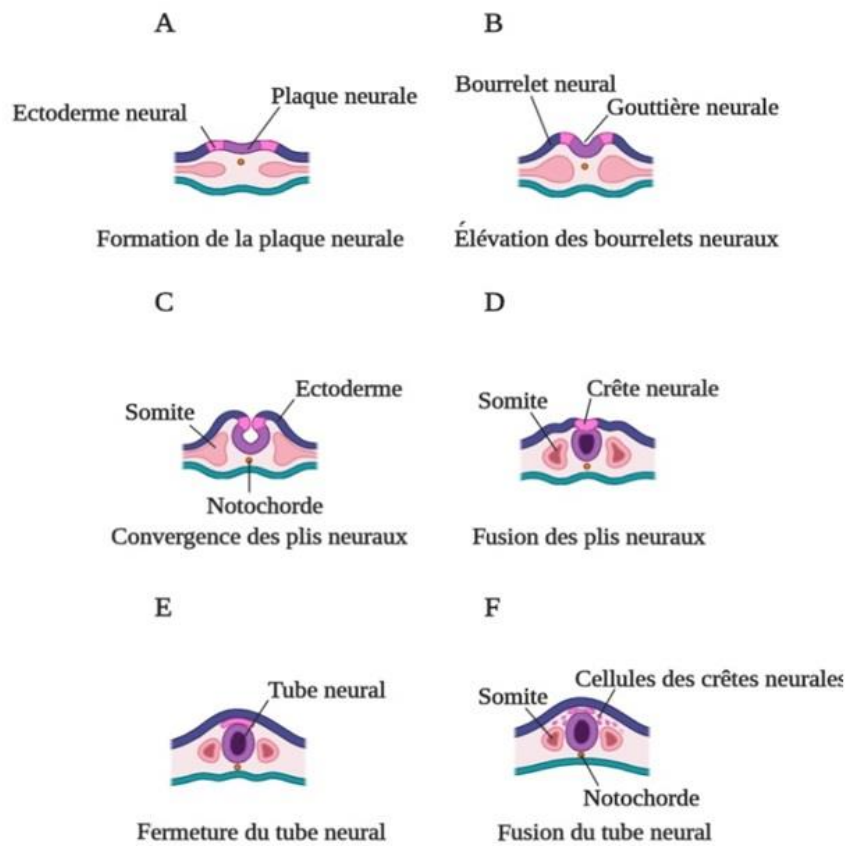


Figure 2 : Neurulation ou formation du tube neural lors du développement embryonnaire. (Adapté de (Gammill and Bronner-Fraser, 2003))

1.3. Organogenèse

La première manifestation visible de la régionalisation du SNC est la formation le long de l'axe antéro-postérieur de vésicules céphaliques (Figure 3). Entre les stades E8 et E9, la partie antérieure du tube neural se divise en 3 vésicules primaires, le prosencéphale (encéphale antérieur), le mésencéphale (encéphale moyen), et le rhombencéphale (encéphale postérieur) (Figure 3A, 3B), alors que la moelle épinière se différencie à partir de la partie postérieure du tube. Ces vésicules primaires vont donner naissance aux 5 vésicules représentatives de l'encéphale des vertébrés que sont le télencéphale et le diencephale (dérivés du prosencéphale), le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale (dérivés du rhombencéphale) (Figure 3C, 3D). Enfin, elles donneront respectivement naissance au cortex, au thalamus/hypothalamus, au tronc cérébral, au pont/cervelet et à la moelle allongée suite à la diversification neuronale.

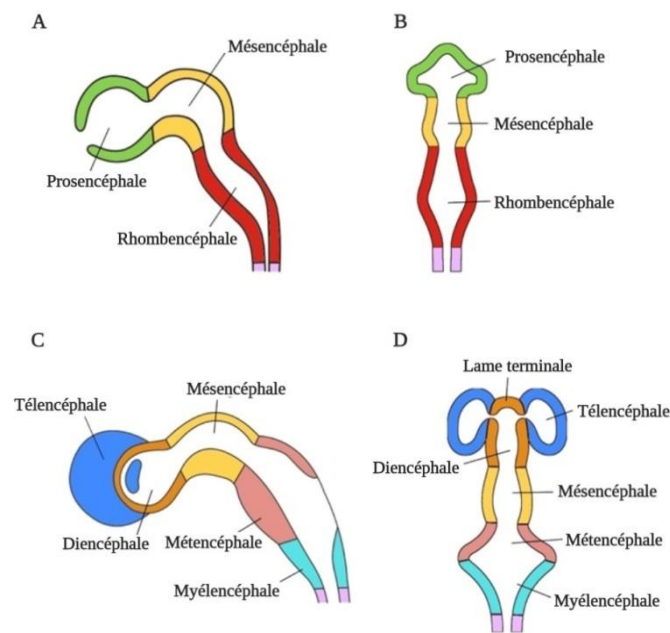


Figure 3 : Représentation des grandes structures du cerveau.

A. Schéma des trois vésicules primaires issues du tube neural antérieur. **B.** Description du stade à 3 vésicules. **C.** Enroulement du télencéphale. **D.** Description du stade à 5 vésicules.

De chaque côté du tube neural restant, le mésoderme s'épaissit et se subdivise en structures appelées somites, les précurseurs anatomiques des vertèbres. Le tube neural dans la région des somites formera quant à lui la future moelle épinière (Wolpert et al., 2015). Sur la face dorsale du tube neural va apparaître une excroissance appelée crête neurale et qui sera à

l'origine du SNP. Ensuite, la crête neurale se détachera du tube pour former les ganglions sensitifs et autonomes de la racine dorsale, *i.e.* les nerfs crâniens et périphériques et les cellules de Schwann. Finalement, il y aura formation des méninges, une structure composée de trois enveloppes (pie-mère, arachnoïde et dure-mère) et du liquide cérébro-spinal (Rice and Barone, 2000).

1.4. Neurogenèse et rôle de la glie radiaire

La neurogenèse est définie comme l'ensemble des mécanismes qui conduisent à la formation, à partir des précurseurs neuronaux de la zone germinative périventriculaire, de neurones fonctionnels intégrés dans un circuit neuronal au sein du SN mature. La neurogenèse débute dans l'ensemble du neuroectoderme dès la cinquième semaine du développement embryonnaire chez l'Homme et à E10 chez le rat. Elle se prolonge jusqu'aux premières semaines après la naissance dans certaines structures (Bonfanti et al., 2013). La neurogenèse implique la participation de plusieurs types cellulaires (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Redmond et al., 2019) et correspond à un processus dynamique qui se déroule en plusieurs étapes, incluant les phases de prolifération, de migration, de différenciation neuronale, de mort cellulaire et d'intégration synaptique.

Les cellules souches neuroépithéliales ont la capacité de s'autorenouveler, de proliférer par divisions symétriques (donnant deux cellules précurseurs de neurones), puis de se différencier en neuroblastes par divisions asymétriques (donnant une cellule précurseur de neurone et un neurone post-mitotique). Selon leur emplacement dans le tube neural, les neuroblastes ne donneront pas les mêmes types de neurones. En effet, les neuroblastes sont essentiellement formés dans la zone ventriculaire (ZV) contenant des cellules souches neurales, et dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) contenant des progéniteurs neuronaux intermédiaires, générés principalement par la glie radiaire (Miyata, 2004; Noctor et al., 2004). Les cellules gliales radiaires sont des cellules polarisées qui présentent un corps cellulaire dans la zone ventriculaire, un contact avec le système ventriculaire au travers d'un cil primaire et étendent un long prolongement vers la surface apicale du tissu nerveux. Pendant la période de neurogenèse (à partir de E10-E11), les cellules de la glie radiaire constituent la majorité des cellules en division de la ZV du cortex embryonnaire (Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2002). Durant la neurogenèse, elles constituent non seulement le support de la prolifération et de la migration des neurones immatures (neuroblastes) mais sont aussi les cellules souches à la source de la quasi-totalité des neurones et cellules gliales du SNC (Malatesta and Gotz, 2013). Le précurseur neuronal quitte l'épithélium neuro-germinatif vers

la zone marginale en migrant le long de la glie radiaire (Noctor et al., 2004). Dans la partie antérieure du tube neural, une production importante de neurones et de cellules gliales est établie à E11 et donne naissance aux neurones corticaux qui peuvent être générés jusqu'à E14-E18 (Bayer and Altman, 1990). Le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur du cerveau mature, exerce un contrôle étroit sur les neurones migratoires: un blocage des récepteurs au glutamate ralentit la vitesse migratoire tandis qu'un excès de stimulation de ces récepteurs induit des arrêts migratoires (Komuro and Rakic, 1993). *L'acide γ -amino butyrique* GABA est également impliqué dans la migration neuronale et exercerait un effet attractif sur les neurones en migration (Behar et al., 1999).

La période de migration neuronale corticale s'étend de E11 à E18 chez la souris (l'équivalent de 10 à 20 semaines chez l'Homme) et peut être divisée en deux grandes périodes. Premièrement, une période précoce où les nouveaux neurones produits s'intercalent au sein de la pré-plaque à E11, donnant naissance à la zone marginale et à la plaque corticale précoce à E13 puis ensuite une seconde période entre E14 et E18 correspondant aux vagues migratoires tangentielles.

Lors de la première étape de migration, les neurones post-mitotiques se libèrent de la ZV pour constituer ce que l'on appelle la pré-plaque, contenant des cellules corticales nouvellement formées (cellules originaires du télencéphale basal), et d'autres cellules nommées cellules de Cajal-Retzius, une population de neurones précoces spécialisés, dont le rôle est crucial dans la formation des couches corticales et qui jouent un rôle important dans le développement du néocortex et de l'hippocampe. Ensuite, les neurones migrent de façon radiaire, au sein de la pré-plaque pour former la plaque corticale précoce et la première couche de neurones.

Les neuroblastes migrent dans un second temps le long de la glie radiaire pour former les couches individuelles du néocortex. Une migration radiaire, par vagues successives de neurones, se met en place. Les neuroblastes nouvellement formés migrent à travers les couches de neurones précédemment différenciés et se déposent sur le versant externe de la plaque corticale, jusqu'à la formation de toutes les couches II à VI (Tarabykin et al., 2001). Les neurones des couches les plus profondes (V-VI) sont générés dans la ZV alors que les neurones destinés aux couches II, III et IV sont issus de la SVZ (Tarabykin et al., 2001). La population de neurones de la couche moléculaire (couche I) est générée en deux temps : les cellules précoces de Cajal-Retzius issues de la ZV sont générées entre E10,5 et E11,5 alors que les interneurons GABAergiques sont produits plus tardivement entre E14 et E18 (Bielle et al., 2005; Hevner et al., 2003).

Outre la migration radiaire, il existe aussi un mode de migration tangentielle des neurones qui débute avant la formation corticale et se poursuit en même temps que la migration radiaire. Elle est observée généralement dans les régions où la glie radiaire est absente. Elle concerne les neurones qui franchissent les régions périventriculaires, tels que les interneurons. Durant cette phase, les neurones se déplacent de façon parallèle à la surface germinative le long d'axones ou d'autres neurones, et franchissent ainsi de grandes distances (Nadarajah and Parnavelas, 2002). Ces différents types de neurones constituent une population hétérogène de cellules qui sont les premières à se différencier et à acquérir des propriétés neuronales.

Vers E16, la gliogenèse commence à l'issue de la neurogenèse et dure jusqu'à la fin du premier mois postnatal. Vers cet âge, la production de neurones cesse et le programme de développement passe largement à l'astrocytogenèse puis plus tard à l'oligodendrogenèse (Qian et al., 2000; Tong and Vidyadaran, 2016). Les précurseurs gliaux générés dans la ZV ou la SVZ migrent vers leurs destinations finales de façon similaire aux neurones.

Dans le développement du SNC, l'apoptose se manifeste tant aux stades embryonnaires que postnataux. Ce processus d'élimination cellulaire est déterminant pour *i)* limiter le pool de cellules prolifératives, *ii)* corriger les erreurs, *iii)* éliminer les structures transitoires apparues au cours du développement et *iv)* participer à l'établissement de connexions synaptiques appropriées (de Graaf-Peters and Hadders-Algra, 2006; Rice and Barone, 2000). En effet, au stade embryonnaire précoce E10 chez la souris, une première vague apoptotique a lieu dès le début de la neurogenèse dans les zones prolifératives et touche les précurseurs neuronaux de même que les jeunes neuroblastes (Lossi and Merighi, 2003). La seconde vague vise les cellules post-mitotiques, aussi bien neuronales que gliales, au cours de leur différenciation terminale et durant la synaptogenèse (Lossi and Gambino, 2008). Par ailleurs, à partir de E12, le nombre de cellules en apoptose augmente fortement pour atteindre un pic vers E14 où 70% des cellules corticales générées entrent en apoptose. A titre de comparaison, seulement 50% des cellules produites vers E18 vont entrer en apoptose. Après la naissance, des cellules en apoptose sont également retrouvées dans le cortex cérébral mais correspondent majoritairement à des cellules gliales telles que les oligodendrocytes qui sont produits en excès pour assurer la myélinisation (McTigue and Tripathi, 2008). De plus, pendant la deuxième semaine postnatale, les cellules de Cajal-Retzius sont également éliminées par apoptose (Derer and Derer, 1990).

2. Système vasculaire cérébral

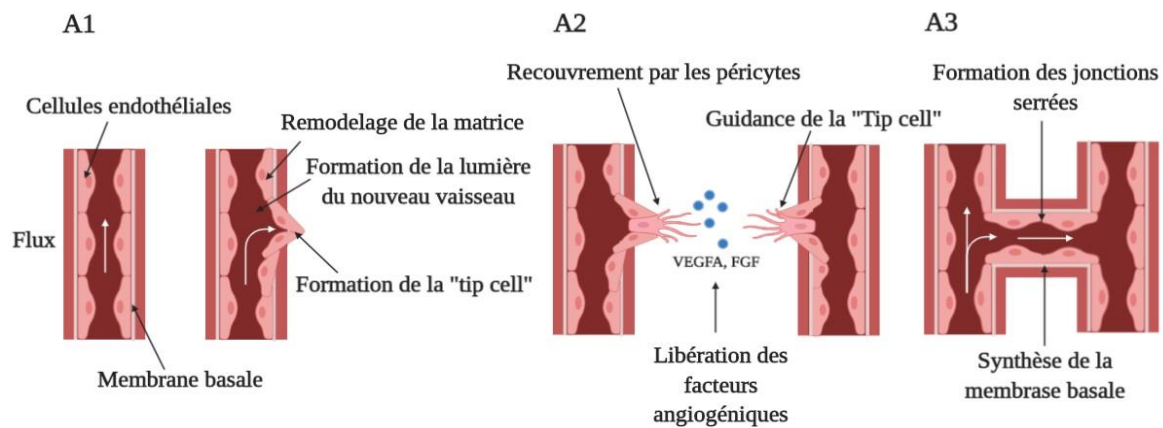
2.1. Vasculogénèse

La formation des vaisseaux sanguins chez l'embryon fait intervenir la vasculogénèse et l'angiogénèse. La vasculogénèse correspond au développement d'un vaisseau sanguin lié à la différenciation *in situ* d'une cellule précurseur en cellule endothéliale qui se multiplie pour former un groupe de cellules puis un réseau vasculaire primitif. La vasculogénèse débute à un stade embryonnaire précoce (E6,5 chez la souris). Pendant cette phase se forme le labyrinthe vasculaire primitif, un assemblage des précurseurs endothéliaux dérivés du mésoderme (angioblastes) (Byrd and Grabel, 2004). Ensuite, les cellules endothéliales apparaissent dans les tissus mésodermiques des régions intra- et extra-embryonnaires et dans des îlots sanguins formant des agrégats cellulaires mésodermiques, nommés hémangioblastes au centre de la structure du sac vitellin, considéré comme le premier site d'apparition des vaisseaux sanguins au cours du développement embryonnaire. Les hémangioblastes, se différencient puis s'agrègent, formant ainsi des îlots sanguins extra-embryonnaires composés de cellules souches hématopoïétiques au centre et d'angioblastes à leur périphérie. Durant cette phase embryonnaire, le réseau vasculaire est relativement instable. Les îlots sanguins ainsi formés fusionnent pour former un plexus capillaire primaire (arbre vasculaire primitif), tandis que les angioblastes se différencient à leur tour en cellules endothéliales à l'origine de l'endothélium composant tous les vaisseaux sanguins. Au niveau du mésoderme embryonnaire, les cellules endothéliales issues de la différenciation des angioblastes migrent et forment les principaux vaisseaux de l'embryon. A E16, le cerveau est encore très peu vascularisé : la vascularisation du cortex se termine seulement après la naissance. Cependant, les plexus choroïdes sont formés rapidement pendant la gestation et participent grandement au transfert des molécules du sang au cerveau (Johansson et al., 2008; Liddel et al., 2009).

2.2. Angiogénèse

Dans la phase d'angiogénèse qui suit la vasculogénèse, un grand nombre de cellules endothéliales sont générées, formant alors de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants pour permettre ainsi le développement et la formation d'un réseau d'artères et de veines (Geudens and Gerhardt, 2011; Risau, 1997). Ce phénomène, débute durant l'embryogénèse (E9,5-E10) (Liebner et al., 2011; Virgintino et al., 1998) et se poursuit après la naissance. Deux mécanismes distincts d'angiogénèse peuvent avoir lieu, l'angiogénèse par bourgeonnement et l'angiogénèse par intussusception (Figure 4).

A. Angiogenèse par bourgeonnement



B. Angiogenèse par intussusception

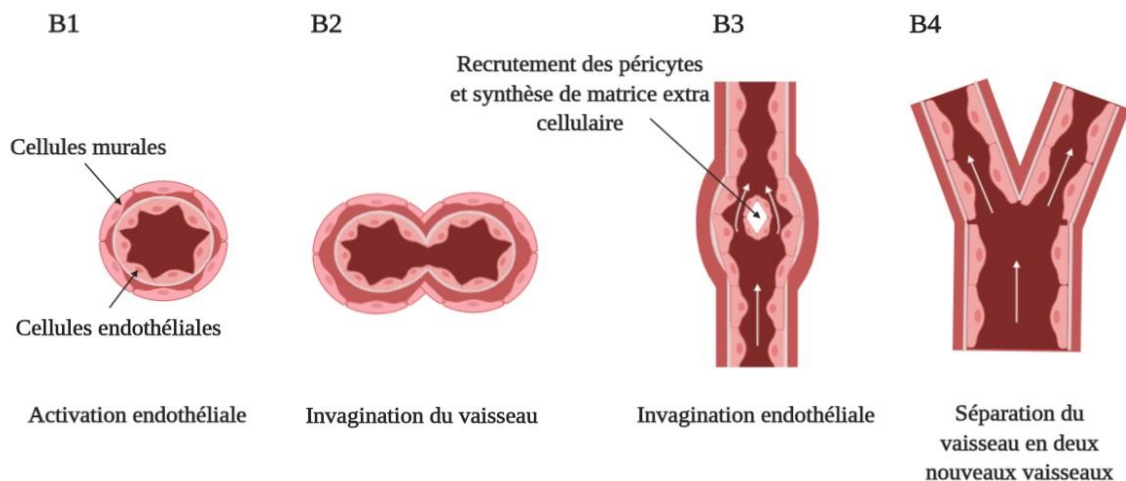


Figure 4: Etapes de l'angiogenèse cérébrale au cours du développement embryonnaire chez la souris.

A. Etapes principales de l'angiogenèse par bourgeonnement. **A1.** Activation de la cellule endothéliale. **A2.** Formation de l'espace de migration pour les cellules endothéliales et libération des facteurs de croissance (FGF, VEGFA) séquestrés dans la matrice extracellulaire. **A3.** Bourgeonnement capillaires, stabilisation des vaisseaux et maturation des cellules endothéliales (Adapté de (Carmeliet and Jain, 2011)).

B. Etapes principales de l'angiogenèse par intussusception. **B1.** Activation de la cellule endothéliale et compartimentation des vaisseaux. **B2.** Invagination de la paroi du vaisseau à l'intérieur de la lumière et création d'une zone de contact entre les deux parois opposées du capillaire. **B3.** Réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales et formation d'une séparation interstitielle. **B4.** Séparation entre les deux vaisseaux néoformés.

Abréviations : FGF : *Fibroblast growth factor* ; VEGFA : *Vascular endothelial growth factor*. (Adapté de (Djonov et al., 2003)).

L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est un processus qui se déroule en deux étapes principales (Figure 4A). La première phase (Figure 4A1) est celle d'activation au cours de laquelle les cellules endothéliales sortent de leur état de quiescence, prolifèrent et migrent afin de constituer un nouveau vaisseau. La seconde phase (Figure 4A2, 4A3), dite de maturation, vise à stabiliser le vaisseau (Figure 4A2) et à le rendre fonctionnel (Figure 4A3) sous l'action de différents acteurs. Au niveau cellulaire, les péricytes se détachent puis les cellules endothéliales migrent et prolifèrent lors de l'élongation des néovaisseaux (Figure 4A2). Cette étape est assurée par des facteurs principaux de l'angiogenèse cérébrale tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) A, le *fibroblast growth factors* (FGF), le *transforming growth factor β* (TGF β) et le *platelet derived growth factor* (PDGF) qui assurent la stabilité des vaisseaux nouvellement formés (Figure 4A2). Le vaisseau quiescent et plus particulièrement la cellule endothéliale sont soumis à de nombreux facteurs qui vont influencer le comportement phénotypique des cellules. En fonction de l'équilibre en facteurs pro ou anti-angiogéniques, le réseau vasculaire va ainsi s'étendre ou régresser (Figure 4A3)(Carmeliet and Jain, 2011).

L'angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception correspond à l'élargissement puis à la subdivision d'un vaisseau sanguin préexistant en deux nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 4B1)(Burri et al., 2004)(Figure 4B). Ce type d'angiogenèse ne nécessite donc pas l'activation des cellules endothéliales. La première étape de ce processus s'effectue lorsque l'endothélium s'invagine et entre en contact avec les jonctions endothéliales (Figure 4B2). Cela entraîne une réorganisation des jonctions intercellulaires puis la formation d'une séparation entre les cellules endothéliales. Par la suite, les cellules fibroblastiques et les péricytes colonisent l'espace intercellulaire et synthétisent la matrice extracellulaire pour stabiliser le vaisseau (Figure 4B3)(Djonov et al., 2003).

**ETHANOL ET SYNDROME
D'ALCOOLISATION
FŒTALE (SAF)**

1. Pharmacocinétique de l'éthanol

1.1. Absorption, distribution et élimination

L'éthanol ou alcool éthylique est une petite molécule de formule $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ absorbée majoritairement par simple diffusion à travers le système digestif. L'alcool diffuse dans l'eau librement sans liaison aux protéines plasmatiques et sa solubilité dans les graisses et les os est négligeable. Si l'absorption de l'alcool reste limitée au niveau gastrique (environ 20% est incorporée dans l'organisme à ce niveau), la majeure partie (70 à 80%) est absorbée au niveau du duodénum et du jéjunum. Une heure environ après l'ingestion d'alcool, le contenu en éthanol du tube digestif est en équilibre avec le sang (Jones and Jönsson, 1994). Cette absorption est cependant influencée par plusieurs facteurs. En particulier, la nature des boissons consommées (degrés et quantités) modifie la vitesse de diffusion. Par exemple, les alcools forts dont la teneur en éthanol est supérieure à 20° entraînent un spasme pylorique qui retarde la vidange gastrique (Holt, 1981). De plus, l'ingestion de nourriture entraîne la fermeture du pylore, ce qui prolonge le temps de présence de l'éthanol dans l'estomac et par conséquent modifie la cinétique d'absorption de l'alcool. L'absorption de l'éthanol est plus rapide si le sujet est à jeun (environ 45 minutes) alors que le pic d'alcoolémie est plus tardif (au-delà de 60 minutes) et moins élevé lorsque l'alcool est ingéré au cours d'un repas. Des différences individuelles peuvent aussi exister avec une pharmacocinétique de l'alcool variable d'une population et d'un individu à l'autre. Des facteurs génétiques peuvent expliquer ces différences. Par exemple, les populations asiatiques, dotées d'une activité acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) déficiente voire nulle, présentent une intolérance à l'alcool en raison d'une accumulation d'acétaldéhyde (Li et al., 2008). Une différence existe aussi en fonction du sexe, avec pour une même quantité d'éthanol consommée et pour un même poids corporel, une alcoolémie plus élevée chez les femmes que chez les Hommes, liée notamment à la quantité de masse grasse et à l'activité de l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH).

La production locale d'acétaldéhyde au niveau des muqueuses digestives contribue à la formation d'une barrière de protection contre l'éthanol (Julkunen et al., 1985), qui est moins active chez la femme que chez l'homme (Baraona et al., 1994), renforçant ainsi la vulnérabilité des femmes vis à vis de l'alcool (Baraona et al., 2001). À cela s'ajoute aussi l'effet des hormones œstradiol et progestérone impliquées dans les cycles menstruels qui modifient l'absorption de l'éthanol (Jones, 2019).

La distribution de l'éthanol dans le sang est très rapide, de l'ordre de 7 à 8 minutes, et se retrouve dans les organes richement vascularisés tels que le foie, les poumons et le cerveau à une concentration équivalente à celle du plasma (Figure 5). Une fois dans la circulation, l'alcool rejoint le foie par la veine porte. La majeure partie de l'éthanol circulant est métabolisée au niveau du foie (85 à 90%) et des quantités faibles peuvent être directement éliminées par les poumons (8 à 10%), les reins (2,5%) et la sueur (1%). Ensuite, l'éthanol encore présent rejoint la circulation générale et diffuse au sein des liquides et des tissus de l'organisme (proportionnellement à la teneur hydrique de ces tissus). Du fait de son caractère hydrosoluble, l'éthanol se fixe faiblement au niveau des tissus adipeux. Mais à l'exception des os et des graisses dans lesquels sa pénétration est négligeable, sa diffusion est très homogène et les concentrations d'éthanol dans ces différents organes sont rapidement équilibrées avec les concentrations sanguines. C'est pourquoi les muscles et le cerveau captent une quantité importante d'éthanol. L'éthanol plasmatique est capable de traverser rapidement les barrières hémato-encéphalique et placentaire. De ce fait, les concentrations dans le liquide amniotique et dans le sang fœtal sont très proches des concentrations plasmatiques de la mère.

L'élimination de l'éthanol est en revanche relativement lente contrairement à sa vitesse de distribution (Silveri and Spear, 2000).

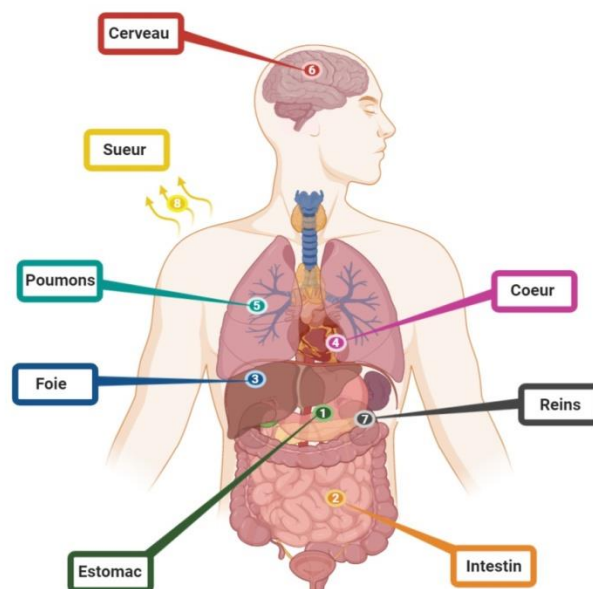


Figure 5 : Trajet de l'éthanol dans l'organisme du corps humain.

L'éthanol passe directement du tube digestif (intestin) dans le sang, et atteint toutes les parties du corps. Les organes les plus exposés sont ceux qui reçoivent la plus grande quantité de sang tels que le cerveau, le cœur et le foie.

1.2.Métabolisme

1.2.1. Voie oxydative

La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'éthanol provient principalement de son catabolisme en acétaldéhyde par les enzymes ADH, cytochrome P450(CYP) 2E1 et catalase. Les ROS sont aussi générées par la transformation de l'acétaldéhyde en acétate par l'ALDH (Rintala et al., 2000). L'ADH est une protéine dimérique contenant deux atomes de zinc par sous-unité. L'ADH appartient en fait à une famille polygénique dans laquelle on peut identifier, chez l'Homme, 7 gènes codant pour des sous-unités différentes nommées ADH1 à ADH7. Ces sous-unités s'associent deux par deux pour former des isoenzymes réparties en cinq classes (classes I à V) en fonction de leurs propriétés électrophorétiques, affinités pour l'éthanol, activités enzymatiques et homologie de séquence (Estonius et al., 1996). L'ADH peut transformer chez un adulte sain 70 mg d'éthanol par Kg corporel et par heure et métabolise ainsi 80% à 95% de l'alcool (Bosron and Li, 1986; Ehrig et al., 1990). L'ADH de classe I présente une forte affinité pour l'éthanol, se trouve majoritairement dans le foie et la surrénale, et en plus faible quantité dans le rein et le poumon (Edenberg, 2000). L'ADH de classe II se trouve dans le foie et le duodénum et contribue à l'oxydation de l'éthanol lorsque sa concentration est élevée. L'ADH de classe III est exprimée dans le foie et la muqueuse gastrique et sa capacité à oxyder l'éthanol est faible. Elle est également exprimée en faible quantité au niveau cérébral depuis l'ontogenèse jusqu'à l'âge adulte (Westerlund et al., 2005). L'ADH de classe IV est présente dans le foie, l'estomac et l'œsophage. Elle se caractérise par une faible affinité pour l'éthanol mais une vitesse de métabolisation élevée (Quertemont, 2004) et serait fortement impliquée dans le métabolisme de l'éthanol au niveau du tube digestif. Seuls les acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant l'ADH de classe V ont été détectés dans le foie et l'estomac sans purification de la protéine. De ce fait, les propriétés enzymatiques et la contribution au métabolisme de l'éthanol de l'ADH de classe V sont non encore déterminées (Östberg et al., 2016).

Le CYP2E1, est une enzyme membranaire localisée principalement dans le réticulum endoplasmique qui présente un polymorphisme génétique. Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui utilisent le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et l'oxygène comme cofacteurs (Goasduff and Cederbaum, 1999). La CYP2E1 est fortement exprimée dans les hépatocytes et présente en quantité plus faible dans les autres tissus tels que le cerveau, le système respiratoire ou les lymphocytes (Thum and

Borlak, 2000). La régulation de son activité dépend de sa biosynthèse (Badger et al., 1993) et/ou de sa biodisponibilité puisque sa demi-vie varie de 7 à 37 heures (Roberts et al., 1995). Son activité conduit à la formation de différentes ROS qui seraient responsables des dommages oxydatifs irréversibles aux biomolécules des constituants cellulaires comme la peroxydation en chaîne des lipides membranaires. En effet, la CYP2E1 génère la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) qui en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des métaux de transition conduit à la formation de radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) hautement réactifs (García-Suástegui et al., 2017; Montoliu et al., 1994). Cette enzyme est capable d'oxyder l'éthanol en acétaldéhyde ainsi que l'acétaldéhyde en acétate (Zimatkin and Deitrich, 1997), avec une affinité 1000 fois plus élevée pour l'acétaldéhyde que pour l'éthanol (Bell-Parikh and Guengerich, 1999; Terelius et al., 1991). L'éthanol induit l'expression d'autres isoenzymes du P450 telles que les CYP1A2 et CYP3A4 qui peuvent contribuer au métabolisme de l'éthanol, mais restent moins actives que la CYP2E1 (Hipólito et al., 2007).

La catalase est une hémoprotéine exprimée dans les peroxysomes de la plupart des tissus et organes. La catalase représente la dernière voie d'oxydation de l'éthanol et elle utilise l' H_2O_2 comme cofacteur. Sa contribution au métabolisme de l'éthanol dans le foie est minoritaire mais elle constitue la principale voie du métabolisme de l'éthanol dans le cerveau où elle est fortement exprimée (Gill et al., 1992; Jamal et al., 2007) contrairement à l'ADH et au CYP2E1 qui sont peu retrouvés (Zakhari, 2006; Zimatkin and Deitrich, 1997). L'expression de la catalase est induite en cas d'alcoolisme chronique (Koechling and Amit, 1992; Koechling et al., 1995).

Les voies ADH, CYP2E1 et catalase convertissent donc l'éthanol en acétaldéhyde, la transformation se faisant principalement dans le foie par l'ADH. L'acétaldéhyde, produit par les activités des voies ADH, CYP2E1 et catalase, est rapidement métabolisé en acétate par l'ALDH. Cette enzyme est localisée dans le cytosol et les mitochondries des hépatocytes, mais se retrouve aussi dans les capillaires cérébraux (Zimatkin, 1991). L'ALDH appartient à une superfamille d'enzymes comprenant 16 gènes chez l'Homme (Vasiliou and Pappa, 2000). Ces enzymes ont une large spécificité pour les aldéhydes issus notamment de la peroxydation des lipides membranaires ou du métabolisme des mono-, di- ou poly-amines. Les deux isoenzymes les plus importantes dans le métabolisme de l'éthanol sont l'ALDH1 et l'ALDH2. L'ALDH1 située dans le cytosol possède une affinité élevée pour l'acétaldéhyde (Vasiliou et al., 2004), chez l'Homme et le rongeur. L'ALDH2 présente dans les mitochondries possède une affinité pour l'acétaldéhyde 1000 plus élevée que l'ALDH1. L'ALDH2 est donc responsable de la majeure partie de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. L'ALDH5 a une

faible affinité pour l'acétaldéhyde; située dans le foie et les reins, sa structure et son activité dans le métabolisme de l'éthanol ne sont pas encore caractérisées (Strömberg and Höög, 2000). Les enzymes ALDH sont fortement exprimées dans l'estomac, le foie, le cœur et les reins (Alnouti and Klaassen, 2008) alors que leur expression est variable dans les différentes structures de cerveau (Tableau 1) et faible dans le placenta, expliquant la forte vulnérabilité de ces tissus aux dommages oxydatifs générés par la production des ROS issues des voies d'oxydation de l'éthanol.

Classes d'ALDH	Homme			Rat			Souris		
	ALDH1	ALDH3	ALDH4	ALDH1	ALDH3	ALDH4	ALDH1	ALDH3	ALDH4
Cortex									
Cortex préfrontal				-	+	-	-	+	-
Cortex visuel				-	+	-	-	+	-
Cortex piriforme				-	+	-	-	+	-
Hippocampe									
Gyrus denté	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Hile (Hilus)	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L'aire des cornes d'Ammon (CA1- CA3)	-	++	-	-	+	-	-	++	-
Cerveau moyen									
Substance noire	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Noyau rouge	-	++	-	-	+	-	-	+	-
Locus coeruleus	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Cervelet									
Couche granulaire	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Cellules de Purkinje	-	++	-	-	++	-	-	++	-
Couche moléculaire	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Substance blanche	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plexus choroïde									
	-	+	-	-	+	-	-	+	-

Tableau 1: Expression de certaines classes d'ALDH dans le cerveau de l'Homme, du rat et de la souris(Adapté de (Galter et al., 2003)).

Abréviation : ALDH, acétaldéhyde déshydrogénase ; -, absence de détection ; +, expression modérée ; ++, forte expression.

1.2.2. Voie non oxydative

En cas de consommation excessive d'alcool, le métabolisme oxydatif de l'éthanol n'est pas suffisant pour permettre son élimination. L'éthanol est alors éliminé *via* des réactions non oxydatives minoritaires qui forment des produits potentiellement toxiques dans les organes comme le cœur (Lange et al., 1981) et le SNC (Laposata et al., 1987) dont les capacités oxydatives sont limitées.

Le métabolisme de l'éthanol génère sous l'action d'une synthétase la formation d'esters éthyliques d'acides gras (*Fatty Acid Ethyl-Ester ou FAEE*). Deux enzymes sont impliquées

dans la formation de FAEE à partir d'alcool : la FAEE Synthase (FAEES) microsomale ou cytosolique et l'Acyl-CoA-Ethanol-O-Acyl-Transférase (AEAT), uniquement microsomale. Après une consommation d'alcool, les FAEE sont détectables dans divers organes tels que le foie, le pancréas, le cœur et le cerveau à des concentrations plus élevées que l'acétaldéhyde. Ces molécules se dégradent beaucoup plus lentement que l'éthanol et leur présence sert de plus en plus comme biomarqueurs de la consommation d'alcool par la mère (Zelner et al., 2013). De plus, l'accumulation de FAEE au niveau de la mitochondrie entraîne son dysfonctionnement qui peut induire une neurotoxicité et la mort par apoptose des cellules (Wu et al., 2006).

L'éthanol peut également se lier sur un groupement phosphate et être transformé en phosphatidyl-éthanol par la phospholipase D (PLD). Ceci engendre des perturbations cellulaires provoquées par la compétition pour le site actif de l'enzyme (PLD) de l'éthanol avec les phospholipides (Attignon et al., 2015). L'interaction de ces composés avec l'éthanol est à l'origine de dégâts tissulaires et de perturbations membranaires observés lors d'une l'alcoolisation chronique (Lange and Sobel, 1983).

2. Mécanismes de défense oxydative

2.1. Les dommages oxydatifs

L'un des mécanismes clés de la toxicité liée à la consommation d'alcool est le stress oxydatif engendré par le métabolisme de l'éthanol en acétaldéhyde et en acétate. En effet, des taux élevés de ROS et des produits d'oxydation des biomolécules sont retrouvés dans le cerveau d'embryons exposés à l'éthanol (Heaton et al., 2002; Peng et al., 2005). Le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydatif, compte tenu de sa forte demande énergétique associée à un métabolisme oxydatif important (il consomme 20% de l'oxygène respiré par l'organisme) et de la faible activité de son système antioxydant endogène (Sokoloff, 1999). De plus, le cerveau possède une teneur élevée en acides gras polyinsaturés membranaires qui sont les cibles de l'attaque oxydative par les radicaux libres. Il est également riche en métaux de transition (fer), composés importants dans le processus de peroxydation lipidique membranaire (Dembale et al., 2006). Le cerveau est donc un organe fortement exposé aux ROS mais peu efficace pour les éliminer et combattre le stress oxydant (Dringen et al., 2000).

La principale source endogène de ROS est la mitochondrie par la chaîne de transport d'électrons. Dans les conditions physiologiques, environ 2 à 5% des électrons s'échappent de

la chaîne respiratoire provoquant une réduction mono-électronique de l'oxygène moléculaire qui produit un radical libre, l' $O_2^{\cdot-}$ (Wei et al., 2001).

L' $O_2^{\cdot-}$ subit une réaction de dismutation spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases (SOD) formant l' H_2O_2 , qui est capable de diffuser librement à travers la membrane plasmique. En présence de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}), l' H_2O_2 donne naissance au radical le plus réactif (OH^{\cdot}) selon la réaction de Fenton (Halliwell, 1989). Le radical OH^{\cdot} est aussi formé au cours du cycle de Haber-Weiss ou encore lors de la décomposition de l'acide peroxyntreux, qui oxyde ensuite rapidement les biomolécules cellulaires formant d'autres radicaux libres. Les ROS sont aussi produits en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NADPH oxydase, la glucose oxydase et les oxyde nitrique synthases (NOS). Les ROS peuvent être générés par la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices comme la ferritine et la transferrine, ainsi que suite à la dégradation des neurotransmetteurs aminés, *i.e.* les catécholamines et la sérotonine par la monoamine oxydase mitochondriale (Pincemail et al., 2002).

2.2.Effets de l'éthanol sur le système antioxydant

La production de ROS par l'éthanol provient principalement de son catabolisme en acétaldéhyde par les enzymes ADH et le CYP2E1. Les ROS sont aussi produits par la transformation de l'acétaldéhyde en acétate par l'ALDH. Cette production de ROS est amplifiée par le fait que l'éthanol stimule l'expression des enzymes ADH et CYP2E1 (Rintala et al., 2000)(Figure 6).

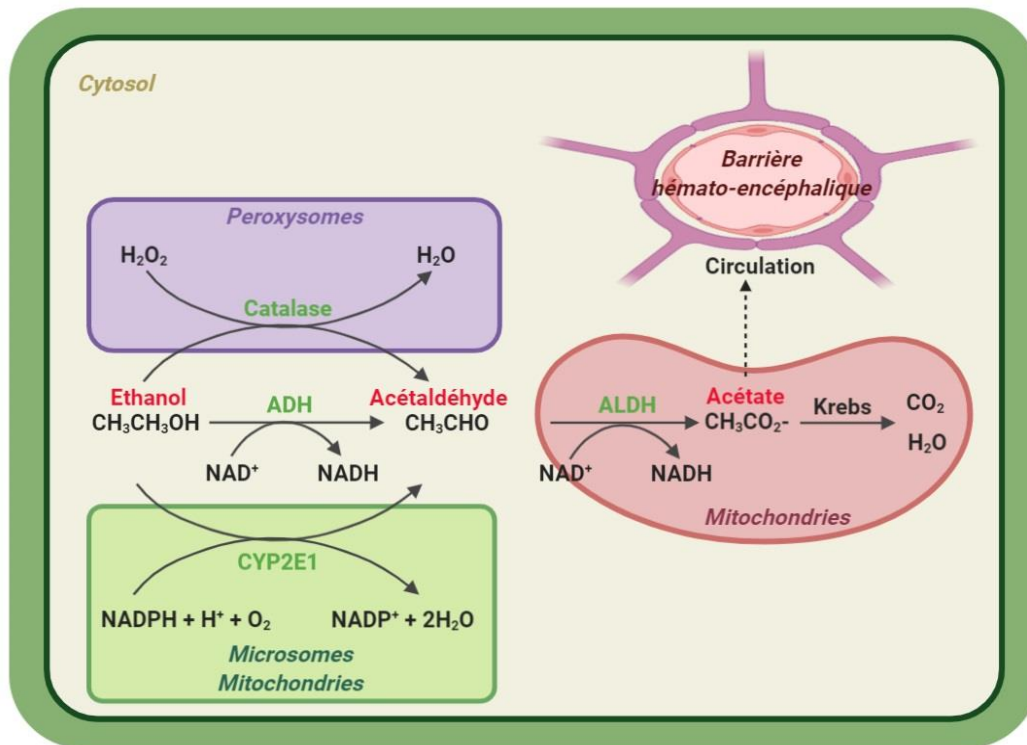


Figure 6 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol.

L'éthanol est métabolisé dans le foie par deux oxydations successives. L'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde fait intervenir 3 voies enzymatiques, l'alcool déshydrogénase (ADH) qui est cytosolique, le système microsomal d'oxydation de l'éthanol qui fait intervenir le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), et la catalase localisée dans les peroxysomes. L'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate est assurée par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) mitochondriale. Abréviations : H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène ; NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée ; $NADH$: Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite ; $NADP^+$: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée ; $NADPH$: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite.

Des produits aldéhydiques peuvent se complexer de façon covalente aux protéines et former des adduits qui provoquent l'oxydation des lipides membranaires et mitochondriaux responsables de la réduction de l'activité et de la quantité d'enzymes antioxydantes. De plus, l'activation de la phospholipase A2 par l'éthanol induit l'oxydation des acides gras polyinsaturés des lipides membranaires comme l'acide arachidonique (Stubbs and Rubin, 1992). L'éthanol est également capable d'induire l'activation des amines oxydases conduisant à la formation du H₂O₂ (Comporti et al., 2010). Enfin, une exposition chronique à l'éthanol peut provoquer, directement ou indirectement, un appauvrissement des antioxydants piègeurs de ROS, et/ou des enzymes antioxydantes endogènes (Zhang et al., 2018).

Les ROS étant très réactives, elles sont capables d'engendrer des modifications chimiques de macromolécules par des réactions d'oxydo-réduction. Les ROS produites par l'alcool représentent des agents hautement réactifs et toxiques provoquant des dommages oxydatifs irréversibles aux biomolécules. Ainsi, les acides gras poly-insaturés des membranes sont des cibles privilégiées de la peroxydation et les protéines peuvent être endommagées par des modifications de type nitration et carbonylation, causant leur dysfonctionnement ou leur dégradation. Des produits aldéhydiques peuvent aussi se complexer aux protéines. Enfin, l'oxydation des bases nucléotidiques est susceptible de causer des mutations au niveau de l'ADN et de l'ARN. Ainsi, le déséquilibre pro-oxydant entraîne de multiples dysfonctionnements cellulaires activant des processus d'inflammation, d'apoptose et/ou de nécrose.

2.2.1. Oxydation des lipides

L'attaque oxydative des lipides membranaires est un processus de réactions radicalaires au cours duquel les acides gras poly- ou mono-insaturés entrant dans la composition des phospholipides membranaires sont oxydés en lipoperoxydes. Mis en contact avec un autre acide gras, ce dernier forme un nouveau diène conjugué (Favier, 2006; Goudable and Favier, 1997). Ce processus en chaîne donne naissance à des aldéhydes très réactifs dont le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA), qui peuvent réagir avec l'ADN ou les résidus lysine, cystéine et histidine des protéines membranaires, altérant ainsi leurs fonctions. Il convient de noter que des taux importants de 4-HNE et de MDA ont été mesurés au niveau des structures cérébrales de souris exposées à l'alcool (Ren et al., 2005), ainsi que dans le cerveau de patients alcooliques (Chen et al., 2011). Ces dégâts moléculaires sont d'autant plus délétères qu'ils perturbent à la fois la fluidité et le caractère amphiphile de la membrane plasmique. Le 4-HNE, augmente également la toxicité de l'éthanol en diminuant le

métabolisme de l'acétaldéhyde et exerce un chimiotactisme à l'égard des neutrophiles favorisant les réactions immunologiques (Bhat et al., 2015).

2.2.2. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines induit le clivage de liaisons peptidiques ou des modifications des chaînes latérales de certains acides aminés tels que, la cystéine, la méthionine ou la tyrosine conduisant à des perturbations à la fois de protéines de structure mais aussi d'enzymes ou de facteurs impliqués dans des voies de transduction ou de régulation d'expression des gènes (Marnett et al., 2003). En effet, l'éthanol contribue à l'oxydation accrue des protéines au niveau des sites de liaison d'ions métalliques, et génère une diminution de la protéolyse cytosolique, plus particulièrement de l'activité des protéasomes (Fataccioli et al., 1999) et de la production des acides aminés défectueux. De plus, l'accumulation de faibles concentrations de ROS peut induire des dommages oxydatifs irréversibles tels que la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leur activité biologique (activité enzymatique, transduction d'un signal ou système de transport). En outre, le stress oxydatif et l'accumulation des ROS génèrent des groupements carbonyles (-CHO) et de la nitro-tyrosine (Haorah et al., 2005). Ces produits carbonylés sont caractéristiques du stress oxydatif et sont donc considérés comme des marqueurs, pouvant être mesurés. Il a été observé qu'une consommation chronique d'alcool provoque un fort taux de carboxylation dans l'hypophyse de rat (Colantoni et al., 2000; Ren et al., 2005) ainsi que dans le plasma et les érythrocytes de patients alcooliques (Grattagliano et al., 1995, 1996; Mutlu-Türkoğlu et al., 2000). Enfin, les protéines peuvent aussi être modifiées par des produits carbonylés issus de la peroxydation lipidique, conduisant entre autres à la formation d'agrégats intracellulaires qui ne sont plus pris en compte dans le processus normal de dégradation protéolytique et, par voie de conséquence, conduisent à l'activation des processus d'apoptose *via* la voie intrinsèque (Kujoth, 2005).

2.2.3. Oxydation de l'ADN

Les radicaux libres générés par une exposition à l'éthanol induisent des mutations et des cassures dans les brins de l'ADN mitochondrial et nucléaire (Miller et al., 2013) altérant ensuite l'expression de nombreux gènes (Rajasinghe et al., 1990). Les mutations sont provoquées par les dommages oxydatifs de l'ADN au niveau des bases puriques et pyrimidiques ainsi que des liaisons phosphodiesteres (Marnett et al., 2003). Les cassures de l'ADN activent la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) dont l'activation prolongée épuise

rapidement les réserves énergétiques de la cellule (Liu et al., 2002). Les études épidémiologiques et expérimentales montrent que l'acétaldéhyde est une substance mutagène, dont l'action peut induire des lésions de l'ADN (Navasumrit et al., 2000). Par ailleurs, des cassures de l'ADN sont également retrouvées dans l'hippocampe et le cervelet après intoxication chronique par l'éthanol (Renis et al., 1996). D'autre part, cet ADN endommagé peut coder pour des enzymes non-fonctionnelles ou des mutations de ce dernier peuvent entraîner un processus de carcinogenèse (Klaunig and Kamendulis, 2004). En effet, l'attaque radicalaire directe induit l'oxydation des bases, engendrant un très grand nombre de bases modifiées, en particulier les bases azotées comme la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou encore la thymine qui donne la thymine glycol.

2.3. Systèmes antioxydants

Face à la production de ROS, l'organisme dispose de systèmes de défense antioxydants divisés en deux groupes : les systèmes enzymatiques et ceux non enzymatiques.

2.3.1. Systèmes enzymatiques

Il existe dans les cellules un système capable de détoxifier les ROS et combattre le stress oxydatif : le système antioxydant endogène qui est composé principalement de 3 familles d'enzymes ; à savoir les SOD, la catalase, et les glutathion peroxydases (GPx), capables de convertir les ROS en composés non toxiques (Figure 7). Le système de défense antioxydant peut aussi s'appuyer sur des antioxydants secondaires non enzymatiques tels que le glutathion réduit (GSH), les vitamines A, C et E ou encore les coenzymes Q qui sont aussi nommés les piègeurs de ROS ou *scavengers*.

Les SOD sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 selon la réaction suivante : $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Figure 7).

Trois isoformes distinctes de SOD ont été identifiées et caractérisées chez les mammifères. Elles exercent des fonctions similaires, mais diffèrent par leur structure protéique, leur localisation chromosomique, leur exigence en cofacteurs métalliques, et leur distribution cellulaire. La première forme SOD1 est cytosolique, également localisée dans d'autres compartiments cellulaires comme le réticulum endoplasmique, les lysosomes et le noyau (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001) et associée aux ions cuivre et zinc (Barkats et al., 1996). La seconde forme SOD2 est mitochondriale et se caractérise par 4 monomères reliés chacun à un atome de manganèse. Enfin, la troisième forme SOD3 est extracellulaire et

se retrouve sur la face externe de la membrane plasmique dans les espaces interstitiels des tissus et dans les liquides extracellulaires (plasma, lymphe) (Miao and St Clair, 2009).

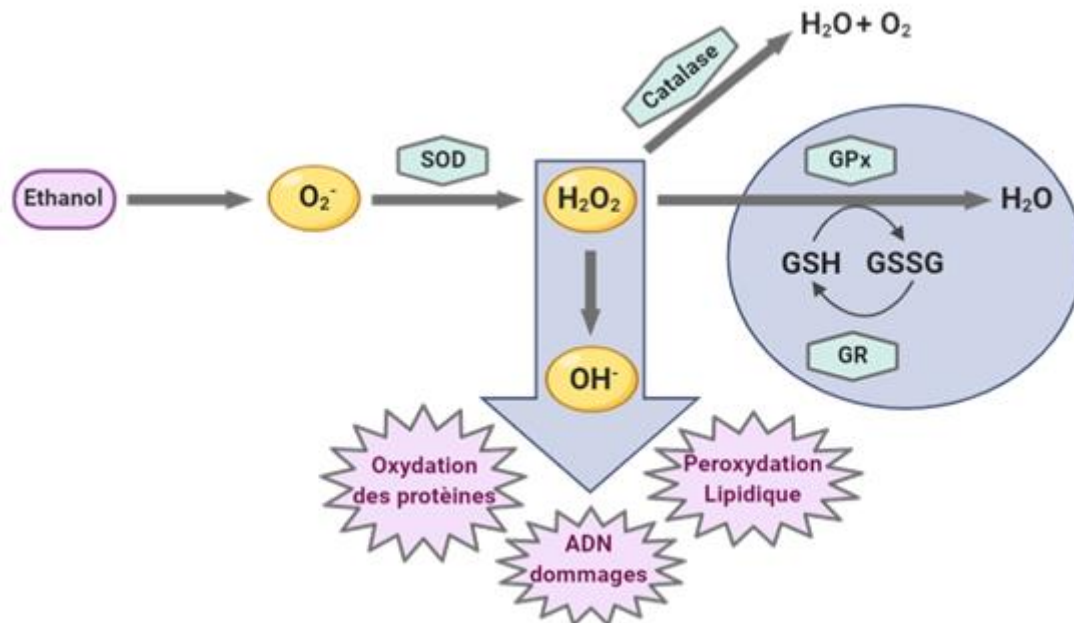


Figure 7 : Dommages oxydatifs induits par le métabolisme de l'éthanol.

L'éthanol stimule l'accumulation des espèces réactives oxygénées telles que les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}). L'exposition prénatale à l'éthanol perturbe le statut redox et l'activité du système enzymatique tel que la superoxyde dismutase (SOD) qui dismute l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , la catalase qui élimine l' H_2O_2 et la glutathion peroxydase (GPx) qui catalyse, en présence de glutathion réduit, la réduction de l' H_2O_2 ou des hydro-peroxydes lipidiques. Suite au métabolisme de l'éthanol, des espèces actives de l'oxygène sont produites dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le cytosol, déclenchant des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques). Abréviations : GR : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : Disulfure de glutathion.

La GPx est une métalloenzyme à sélénium ubiquitaire qui catalyse la réduction du H_2O_2 en eau en utilisant le GSH comme cofacteur (Figure 7).

Elle est principalement active au niveau du cytosol et de la mitochondrie (Ganther, 1999) (Figure 7). La GPx est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection vis-à-vis l'accumulation des ROS, car elle est capable non seulement de détoxifier l' H_2O_2 , mais aussi d'éliminer d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999). La GPx, localisée au niveau cytoplasmique et mitochondrial est une métalloenzyme à quatre sous-unités identiques comportant chacune un atome sélénium. Chez les mammifères, il existe cinq isoformes de la

GPx. On retrouve la GPx-1 et la GPx-4 dans la majorité des tissus au niveau du cytosol ou de la membrane biologique, la GPx-2 dans le tractus gastro-intestinal, la GPx-3 dans le rein et la GPx-5 dans le sperme (Williams et al., 1998).

La catalase (CAT) est une enzyme homotétramérique, dont chaque sous-unité d'un poids moléculaire de 60 kDa comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer (Fe^{3+}). Elle catalyse la transformation de l' H_2O_2 en eau et oxygène selon la réaction suivante : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Figure 7).

Cette enzyme est abondante dans le foie et les érythrocytes. Elle se retrouve dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Figure 7). Même si la catalase et la GPx partagent le même substrat, il a été suggéré que la GPx serait une source importante de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant tandis que la catalase aurait un rôle plutôt dans la protection contre les hauts niveaux de stress oxydant (Zimatkin and Lindros, 1996).

Il faut noter qu'au niveau cellulaire, les enzymes antioxydantes SOD, catalase et GPx jouent un rôle complémentaire et qu'une protection efficace contre les ROS implique la présence des trois enzymes.

2.3.2. Systèmes non-enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont des composés non protéiques, correspondant à des antioxydants secondaires. Ces composés, peuvent être des substances lipo-ou hydrosolubles, capables de piéger les ROS sous une forme peu réactive. Les principales molécules utilisées par la cellule pour cela sont la vitamine C (ou acide ascorbique), la vitamine E (ou α -tocophérol) et le γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine (ou GSH).

Le glutathion est un tri-peptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la GPx, qui existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH).

Au niveau du cerveau, le GSH joue un rôle important dans la dissipation des ROS, et ce grâce à son groupement thiol (-SH) qui est à l'origine de la grande réactivité et de la puissante activité réductrice du GSH. Ce groupement joue également un rôle de cofacteur dans la réaction de dismutation du H_2O_2 catalysée par la GPx (Birben et al., 2012; Quintana-Cabrera and Bolaños, 2013). Le GSH est donc considéré comme un antioxydant majeur, soit en interagissant directement avec différentes ROS, soit en tant que co-substrat de la GPx, ayant un rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG ou soit en régénérant d'autres antioxydants (Forman et al., 2009). De plus, il permet de garder les

groupements SH des protéines cellulaires sous forme réduite, contribuant ainsi au maintien du potentiel redox de la cellule et donc au maintien de bon nombre de processus de signalisation.

Les caroténoïdes sont une autre classe de molécules antioxydantes liposolubles représentés par le β -carotène, aussi nommé provitamine A. Du fait, de sa faible concentration dans l'organisme, son rôle antioxydant est considéré comme faible, mais complémentaire avec les autres systèmes. Le β -carotène est capable de réagir avec les radicaux libres de trois manières: *i*) en assurant le transfert d'électrons, d'hydrogène ou la liaison avec le radical, *ii*) en désactivant les $O_2^{\cdot-}$ et *iii*) en piégeant les radicaux peroxydes ROO^{\cdot} (Krinsky, 1989).

3. Conséquences à court terme d'une exposition prénatale à l'éthanol

3.1. Effets sur le placenta

Le placenta est un organe fortement vascularisé avec un réseau formé par l'accolement des membranes d'origine maternelle (l'endomètre) et fœtale (le chorion) (Burton and Jauniaux, 1995). L'éthanol et l'acétaldéhyde traversent facilement la barrière placentaire par diffusion passive pour aller ensuite directement exercer leurs activités toxiques sur l'embryon puis le fœtus (Blakley and Scott, 1984). Les concentrations d'éthanol dans le liquide amniotique et chez le fœtus atteignent même des valeurs supérieures à celles mesurées dans le sang maternel une demi-heure à une heure après résorption. Ce taux plus élevé chez le fœtus que chez la mère, est directement lié au système enzymatique de détoxification qui chez le fœtus n'est actif qu'à partir du deuxième mois de grossesse. L'élimination de l'éthanol se fait par une oxydation au niveau des hépatocytes fœtaux, mais cette dégradation reste faible pendant toute la période de gestation à cause de l'immaturation hépatique chez les embryons. L'alcool contenu dans le liquide amniotique est réabsorbé par les embryons pour réintégrer la circulation sanguine du fœtus (Perez et al., 2006). Le passage de l'alcool au niveau du placenta peut entraîner une diminution des échanges fœto-maternels (Ramadoss and Magness, 2012) provoquée par des spasmes des vaisseaux sanguins ombilicaux et une baisse des surfaces d'échanges au niveau des villosités placentaires. Des taux élevés d'acétaldéhyde et d'acétate générés lors du métabolisme de l'éthanol modifient aussi l'activité fonctionnelle des vaisseaux ombilicaux, conduisant à une réduction de l'apport en oxygène du fœtus responsable d'épisodes d'hypoxie/ischémie qui favorisent la libération de glutamate. Ce glutamate diffuse dans les différentes régions placentaires et exerce à forte concentration des effets neurotoxiques sur les cellules nerveuses du tissu embryonnaire. L'éthanol pourrait également endommager les trophoblastes et déréguler l'expression des facteurs placentaires

tels que le *placental growth factor* (PLGF) ou le VEGF (Lecuyer et al., 2017). En outre, l'exposition prénatale à l'éthanol perturbe la production placentaire de molécules d'échange de la sphère fœto-maternelle, éléments indispensables pour le maintien de la gestation, telles que les thromboxanes (Siler-Khodr et al., 2000), les cytokines, et la prolactine (Sanchis et al., 1985). L'alcool peut être à l'origine de phénomènes de vasoconstriction des vaisseaux amenant le sang au fœtus et provoquer l'apparition d'un hématome rétro-placentaire (HRP). Ceci pourrait entraîner une mauvaise oxygénation de l'embryon, ainsi qu'un défaut d'apport en nutriments essentiels pour le développement embryonnaire tels que la biotine, la vitamine B6, les acides aminés, l'adénosine, le zinc ou encore les acides gras (Haghighi Poodeh et al., 2012) à l'origine d'avortements spontanés ou de naissances de prématurés avec des hémorragies cérébrales (Thompson et al., 2014). Enfin, plusieurs études ont établi un lien entre l'exposition à l'alcool pendant la grossesse et la perturbation de l'expression de biomarqueurs placentaires tels que le PLGF et le VEGF (Lecuyer et al., 2017; Rosenberg et al., 2010) et des facteurs de croissance tels que l'*epidermal growth factor* (EGF) ou l'*insulin-like growth factor* (IGF-1)(Shukla et al., 2011). Ces perturbations dans l'expression de molécules placentaires importantes pour la croissance embryonnaire expliquent en partie les anomalies de l'angiogenèse cérébrale observées chez les enfants exposés à l'alcool pendant la période embryonnaire (Lecuyer et al., 2017).

3.2. Le syndrome d'alcoolisation fœtale

3.2.1. Epidémiologie

L'alcool est un tératogène responsable de diverses complications et malformations regroupées sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF). Le SAF est considéré par les recherches épidémiologiques comme la principale cause de handicap mental non génétique. L'incidence annuelle oscille entre 0,5 à 3 naissances pour 1000 en France (Serreau et al., 2002), 0,3 à 4,8 naissances pour 1000 aux Etats-Unis (Riley et al., 2011), 5,6 à 6,8 naissances pour 1000 en Italie (May et al., 2014) et 0,25 à 7,4 naissances pour 1000 au Canada (Popova et al., 2019)(Figure 8). Les effets tératogènes peuvent survenir aussi bien à la suite d'un épisode unique de forte alcoolisation maternelle que d'une intoxication chronique. Les diverses statistiques, montrent que la gravité du SAF dépend globalement de la quantité absorbée, du stade de la grossesse, des capacités métaboliques de la mère et de la vulnérabilité individuelle du fœtus même si aucune valeur seuil n'a pu être établie.

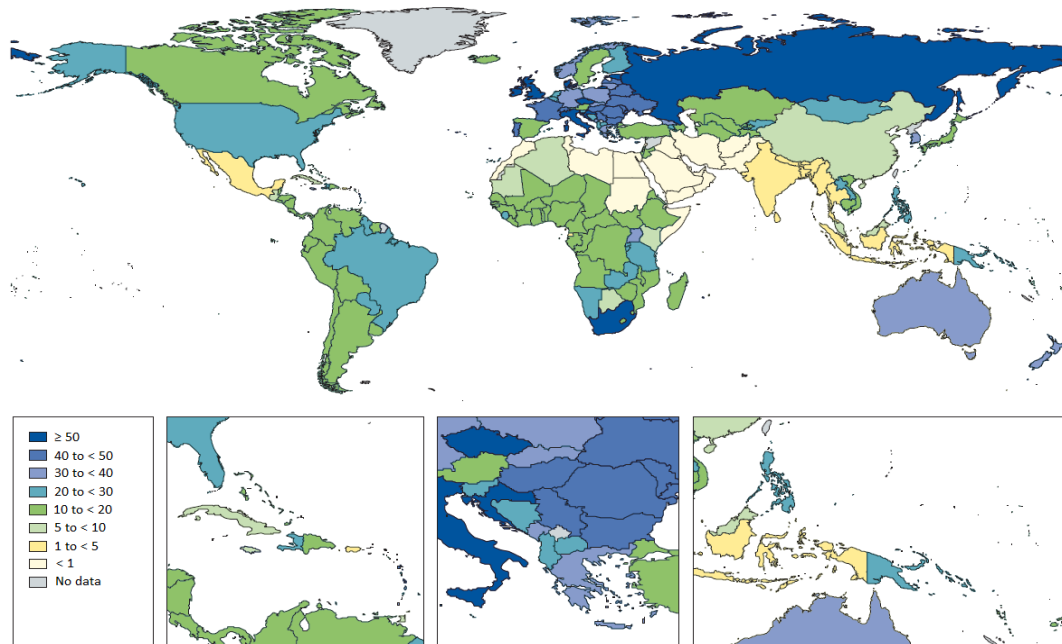


Figure 8 : Prévalence globale du SAF dans différentes populations rapportée à 10000 personnes (Adapté de (Popova et al., 2017)).

3.2.2. Caractéristiques du syndrome d'alcoolisation fœtale

Le SAF a été découvert par Lemoine et son équipe en 1968 (Lemoine et al., 1968), puis décrit avec plus de retentissement par Jones et Smith en 1973. Un nouveau-né diagnostiqué atteint d'un SAF, présente souvent un retard de croissance, des malformations congénitales, une dysmorphie crânio-faciale et/ou des lésions cérébrales, qui se traduisent à l'âge adulte par des déficits cognitifs et comportementaux (Clarren et al., 1978; Jones and Smith, 1973).

L'exposition prénatale à l'alcool entraîne souvent une naissance prématurée, associée à un retard de croissance, à la fois pré- et postnatale. Cette hypotrophie staturo-pondérale est observée en prénatal chez 80% des sujets SAF. Elle s'associe souvent à la prématurité et se traduit à la fois par un retard ou une stagnation du poids, de la taille et du périmètre crânien. Ce retard de croissance entraîne une hypotrophie globale du poids et de la taille de l'embryon (Astley and Clarren, 2001) et son importance est liée à la durée de l'exposition et au stade de développement embryonnaire (Larroque, 1992). Ceci est surtout visible à partir de la seconde moitié de la grossesse avec un poids et une taille inférieure ou égal au 10^{ème} percentile (pour revue, Clarren et al., 1978). Ce retard de croissance entraîne également des désordres métaboliques (hypoglycémie, hypocalcémie) et peut conduire à un véritable nanisme sans dysmorphie. Des études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont mis en évidence une réduction du volume cérébral des enfants atteints du SAF (Lebel et al., 2011; Riikonen et

al., 2005), avec un périmètre crânien inférieur ou égal au 10^{ème} percentile et une microcéphalie persistante (Russell and Skinner, 1988) qui sera plus tard responsable de troubles psychiques liés à un déficit cognitif engendrant des difficultés scolaires pendant l'enfance et à une dépendance aux drogues à l'âge adulte.

Le SAF peut aussi se traduire par des malformations congénitales (Randall and Taylor, 1979). Chez la souris, l'administration d'éthanol vers le 7^{ème} et/ou le 8^{ème} jour de gestation peut produire des anomalies faciales, tandis que des administrations à partir du 9^{ème} et/ou du 10^{ème} jour de gestation conduisent à des anomalies des membres (Webster et al., 1983). Chez l'Homme, les malformations observées sont étroitement liées aux phases de développement des organes affectés. Ces malformations concernent principalement des cardiopathies mais on retrouve aussi des altérations squelettiques conduisant à des déformations du thorax et du rachis, à des anomalies ostéo-articulaires (scoliose, luxation, camptodactylie) et à des raccourcissements des membres. Le SAF peut conduire à des anomalies musculaires provoquant des hernies diaphragmatiques ou ombilicales et à des problèmes cutanés comme des angiomes cutanés ou une diminution du pannicule adipeux, à l'origine d'angiomes tubéreux extensifs, de cutis laxa, d'hirsutisme et d'hypoplasie unguéale. On observe parfois une insuffisance du réseau capillaire sous-cutané, des angiomes tubéreux, de l'hirsutisme et une hypoplasie des ongles. On rapporte également des anomalies des reins qui peuvent être en fer à cheval, former un double pyélon, présenter une hypoplasie ou provoquer une hydronéphrose. Au niveau des yeux, les enfants SAF peuvent souffrir de microphthalmie, de myopie, d'hypermétropie, de strabisme ou encore d'un ptosis des paupières. Les enfants SAF présentent souvent une dysmorphie crânio-faciale qui peut se caractériser par un décollement des oreilles avec anomalie du pavillon, une fissure labiale et/ou palatine (également appelée bec-de-lièvre), un palais ogival avec une voûte palatine élevée et des dents mal alignées. Entre autres malformations faciales, on peut citer un philtrum (espace naso-labial) allongé, des fentes oculaires étroites, une racine du nez effondrée, une lèvre supérieure fine et étroite, un micro-rétrognathisme (menton petit, étroit et en retrait) et des cheveux anormalement implantés. Tous ces signes observables pendant la période néonatale et qui persistent à l'âge adulte donnent le profil caractéristique d'un enfant SAF.

3.3.Effets sur le développement cérébral

Les effets de l'alcool varient en fonction du stade de développement de l'embryon, en particulier pour le cerveau en raison de la mise en place de ces différentes structures tout au long des trois trimestres de la grossesse (Tableau 2).

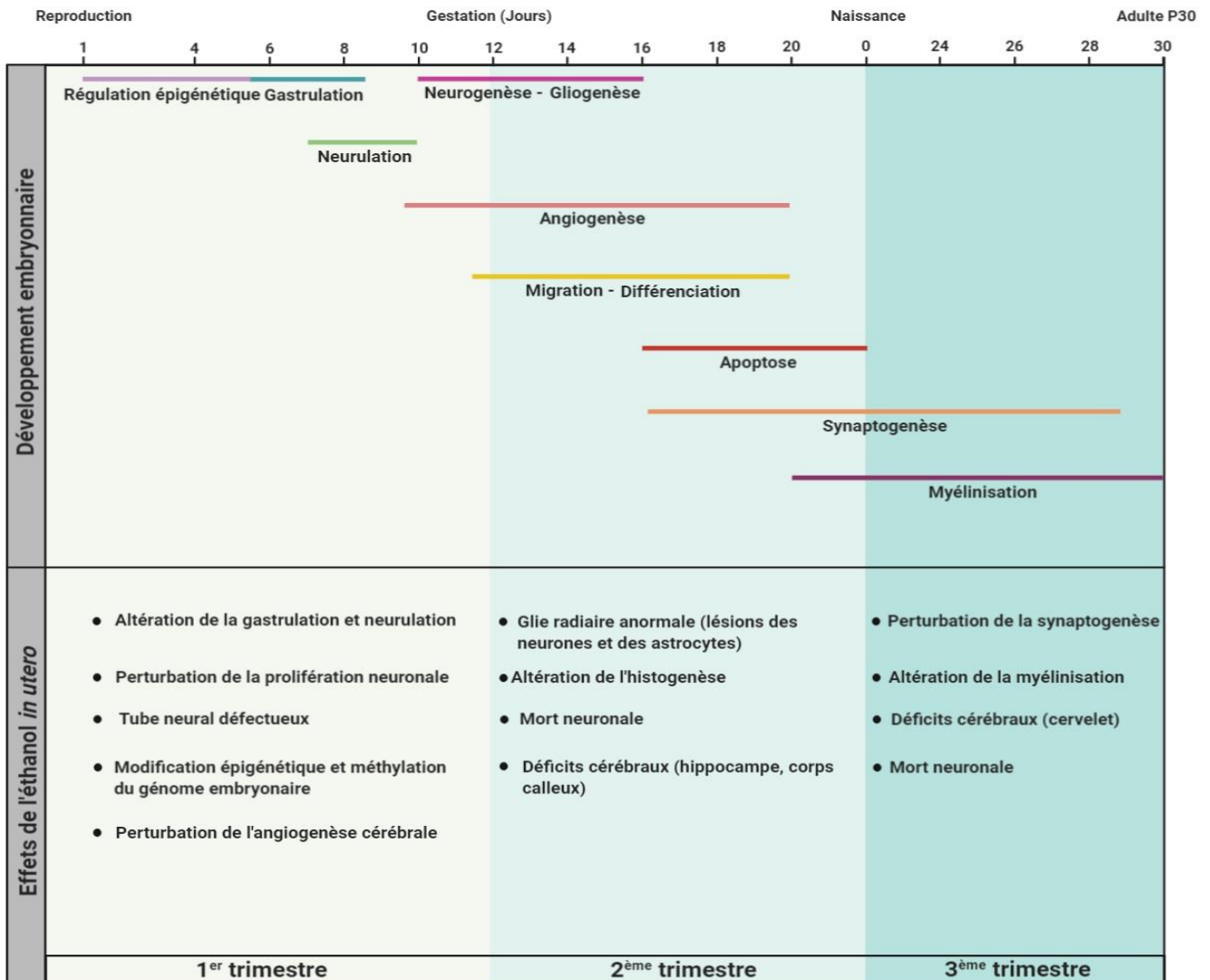


Tableau 2 : Effets de l'éthanol sur le développement du SN embryonnaire tout le long des trois trimestres de gestation chez la souris.

Au stade (E0-E10) équivalent au premier trimestre, l'éthanol *in utero* agit sur le processus épigénétique, la morphogenèse cérébrale (gastrulation-neurulation), et l'angiogenèse cérébrale. Au cours du deuxième trimestre (E11 à E20), l'éthanol *in utero* agit sur l'histogenèse cérébrale. Entre E21 et P30, équivalent au troisième trimestre, une exposition prénatale à l'éthanol retarde la maturation cérébrale en agissant sur la synaptogenèse et la myélinisation. L'exposition prénatale à l'éthanol durant ces stades précoces du développement embryonnaire cause des retards de développement, des malformations, une mort cellulaire et des anomalies cérébrales.

Pendant le premier trimestre, équivalent à la période E0-E10 chez la souris (Guerri, 2002), au cours duquel l'ectoderme puis la plaque neurale qui sont à l'origine du cerveau se mettent en place, une exposition à l'alcool peut perturber la gastrulation, puis la neurulation (voir partie 1.2. du chapitre 1) en réduisant directement la prolifération cellulaire. En effet, l'alcool augmente la durée du cycle cellulaire en réprimant l'expression de neurotrophines comme la NT-3 et de facteurs de croissance tels que Bmp15 (Green et al., 2007; Kleiber et al., 2013), et en altérant la configuration tridimensionnelle des protéines Sonic hedgehog (Hong and Krauss, 2012) et de glycoprotéines telles que Wnt (Green et al., 2007; Hard et al., 2005).

L'alcool cause aussi à ces stades précoces du développement des retards de différenciation cellulaire (Zhou et al., 2011), en réprimant l'expression de plusieurs gènes développementaux cruciaux tels que la nestine ou la protéine paired box 6 (Veazey et al., 2013), ce qui provoque la mort de ces cellules et par voie de conséquence cause par la suite des retards de croissance des différentes structures du cerveau. De plus, l'altération de l'expression de facteurs de transcription, de récepteurs et/ou de canaux ioniques importants dans la mise en place des cellules de la crête neurale (Cartwright and Smith, 1995) provoque des malformations (Guerri, 2002) qui engendrent des anomalies irréversibles du SNC comme une atrophie du cortex, une hydrocéphalie, une microcéphalie, une anencéphalie et/ou des ouvertures dans le toit et le plancher du diencephale (Becker et al., 1996; Sowell et al., 2008).

L'épigénétique joue un rôle crucial dans le développement du SN (Haycock, 2009; Singh et al., 2009) et une exposition prénatale à l'alcool modifie ce profil épigénétique pendant la période critique de la reprogrammation épigénétique qui se situe entre E0,5 et E9 (Marjonen et al., 2018). Ceci affecte non seulement le développement cérébral précoce mais persiste aussi pendant la suite du développement embryonnaire (2^{ème} trimestre) et même jusqu'à l'âge adulte. En particulier, l'éthanol mais surtout son métabolite l'acétaldéhyde, réduisent l'expression d'un important transporteur du folate (RFC1), qui joue un rôle majeur dans le développement du tube neural et du SN en étant le principal donneur de groupements méthyles (Cai et al., 2019) Ils inhibent également l'expression de la coenzyme S-adénosylméthionine, qui agit comme principal donneur de groupes méthyles dans diverses réactions, telles que la méthylation de l'ADN (Chiang et al., 1996). Par ailleurs, l'alcool modifie la méthylation de l'ADN durant le développement du cerveau (Smith and Meissner, 2013), et provoque chez l'embryon (Laufer et al., 2013; Marjonen et al., 2015) des lésions du remodelage de la chromatine au niveau des histones (Downing et al., 2012; Zhou et al., 2011). Ceci affecte l'expression de gènes essentiels au développement cérébral (Downing et al., 2011; Garro et al., 1991; Zhou et al., 2011) et de gènes associés aux voies d'activation du

stress oxydatif potentiellement responsables de dommages cellulaires au niveau du SN (Pagé-Larivière et al., 2017) du fait d'une mort neuronale exacerbée dans certaines zones du cerveau en cours de formation comme la crête neurale dans les phases précoces ou l'hippocampe plus tardivement (Nixon and Crews, 2002). Au final, ceci conduit à des anomalies qui se traduisent généralement par une diminution globale de la masse cérébrale suite à une réduction de la taille des hémisphères cérébraux, de la matière blanche, de la profondeur des sillons et/ou du volume du 3^{ème} ventricule chez l'Homme (Muralidharan et al., 2013) et chez les rongeurs (Petrelli et al., 2018), caractéristique d'une microcéphalie et/ou d'une hydrocéphalie.

En ce qui concerne l'angiogenèse (voir partie 2.2. chapitre 1), l'exposition à l'éthanol *in utero* induit également des changements morphologiques et phénotypiques des cellules endothéliales et des microvaisseaux pendant la grossesse chez la femme (Jégou et al., 2012), correspondant au début de l'angiogenèse E9,5 chez le rongeur (Reemst et al., 2016). L'éthanol altère la perméabilité et l'intégrité membranaire des cellules endothéliales, ce qui rend les vaisseaux plus vulnérables pendant l'angiogenèse cérébrale (Bake et al., 2017; Gordon, 2009) et engendre une vasodilatation (Seleverstov et al., 2017) à l'origine d'une augmentation du flux sanguin cérébral chez le fœtus (Cananzi and Mayhan, 2019).

Néanmoins d'une façon globale, l'exposition à l'éthanol *in utero*, en perturbant l'organisation des microvaisseaux chez les rongeurs et chez l'Homme (Wang and Kroenke, 2015) fait régresser le réseau vasculaire (Parkington et al., 2014; Seleverstov et al., 2017) et désorganise la structuration radiale des microvaisseaux au niveau cortical. L'éthanol induit ces anomalies corticales de l'angiogenèse en altérant l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, IGF-1, l'angiopoïétine-I ou le FGF (Downing et al., 2011; Virgintino et al., 2003), de récepteurs associés comme le VEGF-R1 et le VEGF-R2 (Jégou et al., 2012), de facteurs placentaires tels que le PLGF (Lecuyer et al., 2017) ou de facteurs neurotrophiques comme le *nerve growth factor* (NGF), le *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) et la NT-3 (Carito et al., 2019).

L'histogenèse cérébrale se déroule au cours du second trimestre de grossesse, qui correspond aux stades E11 à E20 chez la souris (Guerra, 2002). Une exposition à l'éthanol durant cette phase du développement embryonnaire agit sur la neurogenèse cérébrale (voir chapitre 1 partie 1.4). Ceci se traduit par une inhibition de la prolifération des précurseurs neuronaux au niveau des régions germinatives ventriculaires et sous-ventriculaires, notamment pour les précurseurs des neurones corticaux (Climent et al., 2002), des neurones hippocampiques (Klintsova et al., 2007) et des cellules du vermis du cervelet (Sowell et al., 1996). En particulier, une exposition *in utero* à l'éthanol réduit le niveau d'expression

d'IGF-1, de BDNF, de NGF (Luo and Miller, 1998) et/ou de *glial cell derived neurotrophic factor* (GDNF)(Tyler and Allan, 2014), considérés comme des facteurs clés dans le contrôle de la prolifération des précurseurs neuronaux (Henderson et al., 1995) ainsi que dans la survie des cellules une fois différenciées. Cette altération de la prolifération des cellules souches neuronales est en partie responsable de l'amincissement de l'épaisseur des couches neuronales (Miller and Nowakowski, 1991).

L'exposition prénatale à l'éthanol, perturbe également la migration et la différenciation des neurones (Tateno et al., 2004), ce qui contribue à la présence de cellules ectopiques dans différentes régions du cortex. L'alcool agit sur les neurones mais modifie le phénotype des cellules gliales radiaires qui servent de guide pour la migration des neurones et leur fournissent des facteurs de croissance (Sancho-Tello et al., 1995). De plus l'alcool, même à faible concentration perturbe la migration neuronale et donc la formation de certains réseaux neuronaux en altérant l'expression de molécules d'adhésion comme la *neural cell adhesion molecule* L1 (Miñana et al., 2000).

L'action néfaste de l'alcool sur les cellules gliales inhibe aussi de façon indirecte la différenciation de nombreux types cellulaires, comme les neuroblastes corticaux (Laev et al., 1995) ou les neurones hippocampiques (Yanni and Lindsley, 2000). De plus, l'exposition *in utero* à l'éthanol altère les interactions des cellules neuronales et gliales indispensables à la mise en place des connexions synaptiques entre les neurones en développement et leurs cibles, ce qui provoque divers déficits cérébraux (Guerra and Renau-Piqueras, 1997; Guerra et al., 2001) tels que des anomalies au niveau de l'arborisation dendritique de l'hippocampe ou des déficits au niveau des épines dendritiques corticales (Tarello-Acuña et al., 2000; Yanni and Lindsley, 2000), perturbant l'ensemble des systèmes de neurotransmission (Costa et al., 2000; Cuzon et al., 2008) à la fois au niveau structural (récepteurs, sites de recapture) mais aussi fonctionnel (modification de l'affinité des récepteurs, altération des systèmes de transduction du message synaptique). Entre autres, l'éthanol déprime la libération de glutamate au niveau de l'hippocampe fœtal et réduit de façon persistante la capacité de liaison du neurotransmetteur dans la région CA1(Reynolds and Brien, 1994), ce qui se traduit ensuite chez les enfants par des déficits fonctionnels touchant la mémoire et l'apprentissage.

Cette inhibition de la différenciation des précurseurs neuronaux réduit la survie des cellules nouvellement produites (Muralidharan et al., 2013). Mais la mort des neurones est aussi provoquée par l'accumulation de ROS engendrée par le métabolisme de l'alcool, qui dans des cellules où les taux de radicaux libres sont déjà élevés, altèrent l'intégrité des membranes et dégradent le matériel génétique jusqu'à conduire à la mort cellulaire comme

cela a été mis en évidence dans l'hippocampe (Barnes and Walker, 1981). Une partie de l'effet toxique de l'alcool au niveau des cellules pyramidales de la zone CA1 de l'hippocampe pourrait venir de sa capacité à activer la microglie et à induire la libération de cytokines pro-inflammatoires tels que l'interleukine (IL)-1 β ou le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α)(Sowell et al., 2008).

Ces anomalies de migration, de différenciation et de survie neuronale conduisent entre autres à des lissencéphalies, des pachygyries, des microgyries et des hétérotopies. Le corps calleux est une des structures qui peut être partiellement altérée durant la vie embryonnaire, voire absente. Ceci entraîne des malformations nommées agénésie du corps calleux qui peut être partielle ou totale durant la vie postnatale et conduire à une hyperactivité, à des difficultés dans l'apprentissage verbal et à des troubles de la coordination motrice comme cela s'observe régulièrement chez les enfants SAF.

Le dernier trimestre de la grossesse, équivalent à la période allant de E21 à P30 chez la souris, correspond à une période de croissance cérébrale intense au niveau des différentes structures en formation. L'exposition à l'éthanol durant cette phase du développement embryonnaire perturbe encore la migration et la différenciation des progéniteurs neuronaux, ce qui conduit à la formation de neurones et d'astrocytes ectopiques et défectueux (Guerra et al., 2001). En plus d'agir sur la synaptogenèse cérébrale, l'éthanol retarde la myélinisation et donc la maturation du cerveau. Dans des structures au développement particulièrement tardif comme le cervelet, l'exposition à l'éthanol au cours du 3^{ème} trimestre provoque une hypotrophie en agissant sur la prolifération des précurseurs neuronaux et leur survie (Sowell et al., 2001).

4. Impacts à long terme d'une exposition prénatale à l'éthanol

4.1. Altérations persistantes du système nerveux

La plupart des anomalies du SN induites par une exposition prénatale à l'éthanol présentées précédemment persistent à l'âge adulte comme l'atrophie des hémisphères cérébraux et du cervelet ou les lésions du tronc cérébral et du corps calleux (Chanraud et al., 2007). De même l'exposition prénatale à l'alcool entraîne une réduction durable de la taille de l'hippocampe et des noyaux antérieurs du thalamus. Ces altérations souvent régions spécifiques (pour revue, Lebel et al., 2011) touchent aussi bien la matière grise (correspondant aux corps neuronaux) que la matière blanche (correspondant aux fibres qui transmettent les informations entre neurones (Bühler and Mann, 2011; Rosenbloom et al., 2003), et sont à

l'origine d'un ensemble de déficits cognitifs et troubles comportementaux que l'on retrouve chez les nourrissons, enfants et adultes (Tableau 3).

Âge	Déficits cognitifs	Références
Nourrisson	- Hypotonie - Agitation, tremblements, succion faible - Instabilité psychomotrice	(Roebuck et al., 1999)
Enfant	- Hyperkinésie	(Vallée and Cuvellier, 2001)
	- Troubles du sommeil	(Manzano and Salvador, 1993)
	- Troubles du langage et de la motricité (déficits de l'attention, retards de développement)	(Salonne et al., 2004)
	- Désordres émotionnels (hypersensibilité)	
	- Difficultés scolaire (QI < 70)	(Mattson et al., 2010)
	- Déficit psychosocial	(Kodituwakku, 2007)
Adulte	- Hyperactivité (déficit de l'attention)	(Hellemans et al., 2010)
	- Retard social	
	- Troubles du comportement et de la communication (incapacité à vivre seul et difficultés relationnelles)	(Crocker et al., 2003)
	- Dépression	(Nestler et al., 2002)
	- Anxiété	(Hellemans et al., 2008)
	- Comportements inadaptés (dépendance aux drogues, suicide)	(DeWit et al., 2000; Heilig and Koob, 2007; Labouvie et al., 1997)

Tableau 3 : Effets de l'éthanol *in utero* à long-terme sur le développement du SN.

Tableau récapitulatif des troubles du comportement et des déficits cognitifs observés chez les sujets SAF (nourrisson, enfant et adulte).

En plus des altérations morphologiques développementales, l'exposition *in utero* à l'alcool est responsable de lésions cérébrales qui apparaissent à l'âge adulte ou au cours du vieillissement du fait d'une grande sensibilité des cellules vis-à-vis de leur environnement. Par exemple, l'effet de l'éthanol sur la morphogénèse des cellules endothéliales fragilise les vaisseaux sanguins qui présentent une membrane basale réduite et un espace périvasculaire agrandi (Caley and Maxwell, 1970) qui vont contribuer à la formation de micro-hémorragies cérébrales et à des pertes neuronales (Xue and Del Bigio, 2005). Ces micro-hémorragies provoquent une activation de la microglie autour des zones de lésions (Goodlett et al., 2005; Kenna et al., 2011) et l'apparition de foyers de cellules GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) positives autour des petits vaisseaux sanguins corticaux. Dans certains cas, cela peut

engendrer à l'âge adulte des hématomes cérébraux et des accidents vasculaires hémorragiques (Bake et al., 2012).

D'autres lésions peuvent aussi apparaître du fait de carences en vitamines de type B1, B2, B3 ou B12 chez les personnes exposées à l'alcool pendant la vie embryonnaire. C'est ainsi que la carence en thiamine diphosphate (vitamine B1), un cofacteur de plusieurs enzymes clés du métabolisme cellulaire, altère l'activité mitochondriale, le métabolisme oxydatif et la viabilité neuronale (de la Monte and Kril, 2014). Ceci engendre une perte de plasticité neuronale (de la Monte and Kril, 2014), une atrophie de la substance blanche et un élargissement des ventricules (Sullivan and Pfefferbaum, 2009) conduisant à des encéphalopathies telles que le syndrome de Wernicke-Korsakoff (Butterworth et al., 1993).

4.2. Vulnérabilité en cas de nouvelles agressions du cerveau

L'alcool modifie aussi durablement les systèmes de neurotransmission cérébrale (Sari et al., 2010) en stimulant par exemple la production de glutamate et en inhibant des systèmes de recapture (Brolese et al., 2015). Ceci peut provoquer des lésions cérébrales, diminuer la pression intracrânienne, comprimer le système vasculaire (Bake et al., 2017) et engendrer des épilepsies éthyliques, un delirium tremens (Schuckit, 2014) ou des ischémies cérébrales (Bake et al., 2017). Une exposition *in utero* à l'alcool même transitoire provoque également un déséquilibre du système antioxydant conduisant à une accumulation de ROS qui se maintient à l'âge adulte (Brocardo et al., 2011; Henderson et al., 1995). De ce fait, le cerveau adulte, devient plus vulnérable aux agressions de son environnement d'autant plus que cela s'accompagne souvent d'une exacerbation de la réponse immunitaire cérébrale (Bodnar et al., 2016) et d'une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE)(Phillips et al., 1997). En conséquence, les dommages cérébraux chez les personnes exposées à l'alcool pendant le développement seront plus importants en cas de trauma ou d'ischémie cérébrale.

**PITUITARY ADENYLATE
CYCLASE-ACTIVATING
POLYPEPTIDE (PACAP)**

1. Découverte

L'activité du lobe antérieur de l'hypophyse est contrôlée par diverses neurohormones synthétisées par des neurones hypothalamiques. Ces facteurs hypophysiotropes sont ensuite libérés dans les anses capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire puis transportés jusqu'au lobe antérieur de l'hypophyse (Reichlin, 1989). L'équipe du professeur Akira Arimura a mené un projet visant à identifier de nouveaux facteurs hypophysiotropes à partir d'extraits de 4300 hypothalamus ovins. Leur objectif était de rechercher la capacité de fractions purifiées par des méthodes chromatographiques à stimuler l'activité de l'adénylyl-cyclase (AC) présente dans des cellules adénohypophysaires de rat en culture (Miyata et al., 1989). En 1989, ils ont identifiés par cette approche, une fraction contenant un peptide de 38 acides aminés α -amidé en son extrémité C-terminale capable de fortement stimuler la production d'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC), et qui de ce fait a été dénommé *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38* ou PACAP38. L'année suivante, les mêmes chercheurs ont isolé et caractérisé un peptide α -amidé de 27 acides aminés, correspondant à la région N-terminale du PACAP38 (Miyata et al., 1990). Ce peptide, dénommé PACAP27, est issu par clivage protéolytique du même précurseur que le PACAP38. Le PACAP27 est présent en moindre quantité que le PACAP38 dans l'hypothalamus de mouton mais possède une activité stimulatrice de l'AC similaire à celle du PACAP38.

2. Description du peptide

2.1. Structure du peptide

L'analyse de la séquence peptidique du PACAP38 a révélé la présence de sept résidus lysine (Lys) ainsi que de quatre arginine (Arg) qui confèrent à ce peptide un caractère fortement basique (Miyata et al., 1989). Les deux isoformes possèdent des activités biologiques similaires. Le PACAP27 partage 68% d'homologie de séquence avec le *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) et l'analyse phylogénétique permet de classer le PACAP dans la famille du VIP, de la sécrétine, du glucagon et de la *growth hormone-releasing factor* (GRF) (Vaudry et al., 2000a). Les homologies de séquence entre tous les membres de cette famille sont particulièrement retrouvées dans la partie N-terminale des peptides. En effet, on retrouve généralement un résidu aromatique histidine (His) ou tyrosine (Tyr) en position 1, un résidu de faible poids moléculaire en positions 2 et 4, un résidu chargé négativement en position 3 (acide aspartique (Asp) ou acide glutamique (Glu)), une

phénylalanine (Phe) en position 6 et une thréonine (Thr) en position 7 (Bourgault et al., 2011). Cette conservation de certains résidus dans la partie N-terminale suggère qu'ils sont cruciaux pour l'activité biologique de ces peptides. Des dosages radio-immunologiques effectués chez le rat, révèlent que le PACAP38 est la forme moléculaire principale, que ce soit au niveau du SNC ou dans les tissus périphériques, puisque la forme tronquée de 27 acides aminés ne représente en général qu'environ 10% de l'ensemble du PACAP retrouvé (Arimura et al., 1991). Si les deux isoformes PACAP38 et PACAP27 stimulent l'AC avec la même efficacité (Hou et al., 1994; Robberecht et al., 1992a, 1992b), le PACAP38 active la phospholipase C (PLC) avec une puissance supérieure à celle du PACAP27 (Deutsch and Sun, 1992; Pantaloni et al., 1996; Spengler et al., 1993). La structure secondaire du PACAP déterminée par des analyses conformationnelles a révélé l'existence d'un domaine N-terminal (résidus 1-8) désorganisé suivi par une hélice alpha dont la longueur et le positionnement sont variables. La région C-terminale (28-38) présente une structure hélicoïdale équilibrée et rattachée à la région centrale du PACAP par un connecteur formé par les résidus leucine-27 et glycine-28 (Bourgault et al., 2011; Inooka et al., 1992, 2001; Vaudry et al., 2000a). L'étude comparative de la structure secondaire du PACAP27 avec celle d'analogues du VIP montre que les deux peptides présentent une conformation assez similaire. Cette organisation commune aux membres de la famille du glucagon suggère une interaction similaire des ligands avec leurs récepteurs (Braun et al., 1995; Brünger et al., 1987).

2.2. Evolution phylogénétique

Le PACAP a été retrouvé chez de nombreuses espèces incluant l'Homme (Ohkubo et al., 1992), les oiseaux et les amphibiens (pour revue, Vaudry et al., 2009). L'analyse de la séquence primaire du PACAP révèle que le peptide a été hautement bien conservé au cours de l'évolution et possède quelques divergences au niveau de la partie C-terminale (28-38) chez certains vertébrés. En revanche le segment (1-27) est identique chez la majorité des espèces et ne diffère que d'un seul acide aminé chez le poulet (McRory et al., 1997), la grenouille (Chartrel et al., 1991) et le poisson (Matsuda et al., 1997). Chez l'Homme (Ohkubo et al., 1992), le rat (Ogi et al., 1990), la vache (Sayasith et al., 2007) et la souris (Okazaki et al., 1995), la séquence est identique à celle initialement rapportée chez le mouton (Miyata et al., 1989). En effet, au sein de la famille sécrétine/glucagon/*gonadotropin releasing hormone*, le PACAP correspond au peptide le plus conservé au cours de la phylogenèse, ce qui suggère qu'il exerce des fonctions biologiques particulièrement importantes (Sherwood et al., 2000; Vaudry et al., 2000a).

2.3. Biosynthèse du PACAP

Le gène du PACAP a été cloné chez de nombreuses espèces dont l'Homme (Daniel and Habener, 2000), la souris (Yamamoto et al., 1998b) et le rat (Yamamoto et al., 1998a). Chez l'Homme, le gène codant pour le PACAP est localisé sur le bras court du chromosome 18, au niveau du locus p11 (Hosoya et al., 1992; Ohkubo et al., 1992). La structure de ce gène est similaire à celle du gène codant pour le VIP, avec 5 exons et 4 introns, qui s'étendent sur 6,6 kb et produit un prépro-PACAP de 176 acides aminés. L'exon 1 ainsi que la partie 3' de l'exon 5 correspondent à des régions non traduites, alors que les exons 2, 3 et 5 codent respectivement le peptide signal, un peptide espaceur et le PACAP. L'exon 4 quant à lui code le *PACAP-related peptide* (PRP), un autre peptide de la même famille dont la fonction n'a été que peu étudiée à ce jour (Sherwood et al., 2000). La région promotrice du gène codant le PACAP comporte plusieurs sites d'initiation de la transcription ainsi que différents sites de polyadénylation (Miyata et al., 2000; Yamamoto et al., 1998a). Le promoteur contient également plusieurs régions régulatrices, parmi lesquelles deux séquences de réponse à l'AMPc ou CRE, un élément de réponse au TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) ou *TRE*, deux sites de liaison pour le *growth hormone factor-1* (GHF-1), un facteur régulant l'expression tissu-spécifique de l'hormone de croissance et un domaine riche en CT précédé d'une boîte GC reconnue par le facteur de transcription Sp1 (Bodner et al., 1988; Castrillo et al., 1991; Dollé et al., 1990; Hashimoto et al., 2000; Hosoya et al., 1992; Suzuki et al., 1994). La biosynthèse du PACAP est un processus complexe reposant sur un mécanisme de maturation post-traductionnelle à partir du clivage protéolytique de son précurseur le prépro-PACAP en pro-PACAP. La traduction du gène donne naissance à un peptide précurseur, constitué de 176 acides aminés (19,5 kDa), nommé le prépro-PACAP, qui comprend un peptide signal de 24 acides aminés ainsi que 7 sites de clivage par les prohormones convertases (PC) de type PC1, PC2 et PC4.

Suite au clivage du peptide signal du prépro-PACAP au niveau du réticulum endoplasmique, le pro-PACAP est sujet à une intense activité enzymatique par les PC, donnant naissance à deux peptides biologiquement actifs de 38 et 27 acides aminés correspondant respectivement au PACAP38 et au PACAP27 (Ogi et al., 1990) (Figure 9). Le pro-PACAP subit aussi une carboxypeptidation par des carboxypeptidases de type E et H, et une amidation de sa partie C-terminale par la *peptidylglycine α -amidating monooxygenase* (PAM), conduisant à la formation du PACAP et du PRP. Le PACAP38 correspond au fragment [131-169] du prépro-PACAP et résulte du clivage d'un doublet basique Lys¹²⁹-

Arg¹³⁰ à son extrémité N-terminale et Arg¹⁷⁰-Arg¹⁷¹ à son extrémité C-terminale ; le résidu Gly¹⁶⁹ permettant l'amidation de la lysine C-terminale. La génération du PACAP27 à partir du PACAP38 se fait par un processus de protéolyse entre deux résidus basiques, suivi d'une amidation au niveau de la séquence Gly¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹-Arg¹⁶⁰ (Miyata et al., 1990; pour revue, Moody et al., 2003; Vaudry et al., 2000a). Plusieurs transcrits alternatifs du PACAP ont été identifiés chez les vertébrés, à savoir un transcrit long codant le PACAP et le PRP et un transcrit plus court codant uniquement le PACAP (McRory et al., 1995, 1997; Parker et al., 1993, 1997). Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), un autre transcrit alternatif dépourvu de l'exon 3 a été rapporté (Krueckl et al., 2003). De plus, des techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont mis en évidence la forte expression du PACAP dans l'ensemble du SNC et les organes périphériques, suggérant un rôle majeur de ce polypeptide dans de nombreuses activités biologiques et fonctions vitales.

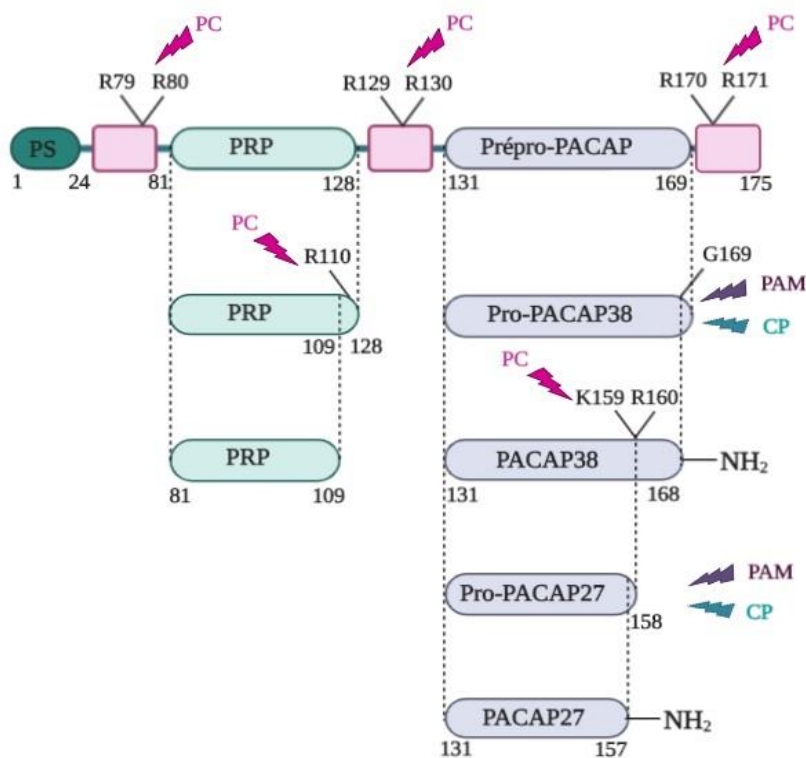


Figure 9 : Représentation schématique du précurseur du neuropeptide PACAP et de sa maturation post-traductionnelle.

Abréviations : PS : Peptide signal ; PRP : *PACAP-related peptide* ; PAM : peptidyl glycine α -amidating monooxygenase, PC : Prohormones convertases ; CP: Carboxypeptidase.

2.4. Libération et dégradation du PACAP

Malgré sa large distribution dans l'organisme peu d'informations sont disponibles sur la libération du neuropeptide qui semble se faire principalement au niveau des terminaisons nerveuses (Kimura et al., 1994). Il fut démontré que dans l'hypothalamus, le PACAP est localisé dans de grosses vésicules de sécrétion à noyaux denses contenues dans les fibres nerveuses (Kimura et al., 1994). Par ailleurs, des études sur des cultures de neuroblastomes humains de type IMR-32 ou des neurones de ganglions nerveux cervicaux montrent que la dépolarisation des cellules de neuroblastomes et l'administration de dibutyrylAMPc ou d'esters de phorbol stimulent la libération de PACAP (Suzuki et al., 1993). Il est à noter que le PACAP38, le PACAP27 et le VIP provoquent la libération de PACAP38, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de régulation autocrine (Suzuki et al., 1994).

Les peptides sont connus pour leur faible stabilité métabolique provenant de leur haute susceptibilité à la protéolyse. Le PACAP est ainsi rapidement dégradé dans la circulation sanguine avec une demi-vie d'environ 5 minutes (Zhu et al., 2003) du fait du clivage par plusieurs enzymes présentes dans l'organisme telles que la dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV), les carboxypeptidases (CP) ou des endopeptidases plasmatiques neutres (Gourlet et al., 1997a; Zhu et al., 2003). La DPP-IV est une enzyme membranaire et ubiquitaire largement distribuée dans de nombreux tissus, en particulier à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Zhu et al., 2003). Comme dans tout l'organisme, elle agit au niveau du SNC et de la BHE en clivant des dipeptides à partir de l'extrémité N-terminale de ses substrats (Mentlein, 1999). C'est ainsi que la DPP-IV hydrolyse le PACAP38, en PACAP(3-38) puis en PACAP(5-38), en clivant entre les résidus Ser²-Asp³ et Gly⁴-Ile⁵. Les résidus histidine-1 (His-1) et sérine-2 (Ser-2) étant particulièrement importants à l'activité biologique du PACAP, cette protéolyse conduit à la formation d'un antagoniste qui va inhiber l'activité du peptide endogène (Arimura et al., 1991; Hannibal et al., 1995; Piggins et al., 1996; Zhu et al., 2003). En revanche, des études ont montré par spectrométrie de masse que dans le plasma, la DPP-IV présente une faible affinité pour le PACAP27 (Bourgault et al., 2008b, 2009a; Zhu et al., 2003).

Dans la circulation sanguine, le PACAP38, s'associe avec une protéine plasmatique appelée céruloplasmine. Cette liaison permet d'augmenter sa stabilité vis-à-vis des enzymes de dégradation (Tams et al., 1999). Néanmoins, il a été montré que la demi-vie du PACAP38 n'est que de 2 à 10 min lorsque ce dernier est injecté chez l'Homme ou la souris (Li et al.,

2007; Zhu et al., 2003). De plus, si la liaison du PACAP38 à la céruloplasmine protège le peptide, elle entraîne une diminution de la concentration de PACAP libre, et réduit donc son efficacité (Tams et al., 1999).

3. Distribution du PACAP

Le PACAP est très largement distribué dans l'ensemble de l'organisme, tant au niveau du SNC que du SNP.

3.1. Dans les organes périphériques

Le PACAP est principalement retrouvé dans des fibres nerveuses innervant de nombreux organes comme par exemple ceux du système lymphoïde (Gaytan et al., 1994), incluant le thymus et la moelle osseuse (Vaudry et al., 2009), ou du système cardiovasculaire avec une riche innervation PACAPergique des tissus musculaires lisses, suggérant que le PACAP agit sur la motricité vasculaire (Marzagalli et al., 2015). On retrouve également du PACAP dans des fibres nerveuses innervant les glandes endocrines telles que l'hypophyse antérieure, les surrénales et le pancréas (Vaudry et al., 2009), indiquant que le peptide pourrait participer au contrôle neuroendocrinien de certaines sécrétions hormonales. Ce peptide est aussi retrouvé dans beaucoup d'autres tissus, notamment au niveau des voies respiratoires, dans le nez, le larynx, la trachée, les bronches ou les poumons (Arimura et al., 1991; Moller et al., 1993; Uddman et al., 1991) ; du système digestif, dans les glandes salivaires (Moller et al., 1993), le foie, l'estomac (Arimura et al., 1991; Hannibal et al., 1997; Moller et al., 1993), l'intestin (Arimura et al., 1991) ou le pancréas exocrine (Fridolf et al., 1992) ; du système reproducteur et urinaire, dans les reins, la vessie et les gonades (Arimura et al., 1991). On retrouve aussi du PACAP dans les glandes parathyroïdes (Jansen-Olesen et al., 1994; Luts and Sundler, 1994; Uddman et al., 1991) ou au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux (Jansen-Olesen et al., 1994).

3.2. Dans le placenta

Des études de dosage radio-immunologique et d'hybridation *in situ*, montrent que le PACAP est exprimé dans différentes structures placentaires chez les rongeurs et l'Homme (Koh et al., 2005; Scaldaferrri et al., 2000). Les deux formes de PACAP, sont retrouvées dans le placenta (Sreedharan et al., 1995), avec une immunoréactivité plus forte pour le PACAP38, tant du côté maternel que fœtal (Brubel et al., 2010). La densité en ARNm codant le PACAP dans le placenta varie selon les régions et le stade de gestation (Koh et al., 2003). Chez les

rongeurs, le PACAP est retrouvé au niveau des cellules déciduales dès le 13,5^{ème} jour de gestation. Son expression augmente ensuite pendant la seconde moitié de la gestation (entre le 18,5^{ème} et le 21,5^{ème} jour). Cette évolution de l'expression du PACAP au cours du développement, suggère que le peptide joue un rôle dans la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules placentaires (Koh et al., 2003). Entre le 18^{ème} et 21,5^{ème} jour de gestation, l'expression du PACAP augmente surtout au niveau des cellules stromales et des villosités chorales du placenta, où il pourrait exercer un effet trophique. La localisation de l'expression du PACAP suggère qu'il joue un rôle dans les échanges sanguins fœto-maternels (Koh et al., 2003). Il est maintenant bien établi que de nombreux peptides peuvent traverser la barrière placentaire de manière passive (Chandorkar et al., 1999). Bien que les gènes du PACAP sont exprimés dans le placenta chez le rat et l'Homme (Koh et al., 2005; Scaldaferrri et al., 2000), la capacité du PACAP à franchir la barrière hémato-placentaire n'a pas encore été étudiée. En revanche, il a été montré chez la souris que le PACAP peut traverser la barrière hémato-testiculaire, laquelle est connue pour être plus étanche que la barrière placentaire (Banks et al., 1993).

La capacité du PACAP administré en périphérie à traverser efficacement la BHE et à agir au niveau central laisse penser qu'il serait capable de franchir la barrière placentaire.

3.3. Au niveau de la BHE

Il a été démontré chez la souris, que le PACAP est l'unique membre de la superfamille VIP/GRF/glucagon capable de traverser la BHE grâce à un système de transport spécifique bidirectionnel, alors que la majorité des peptides transite généralement de façon unidirectionnelle à travers la BHE, en allant du cerveau vers la périphérie (Dogrukol-Ak et al., 2004). Si les deux formes actives du PACAP sont capables de franchir efficacement la BHE elles utilisent un type de transport différent (Banks et al., 1993) (Figure 10).

En effet, le PACAP27 diffuse vers le cerveau de manière passive et non saturable par passage transmembranaire (Banks et al., 1993; Dogrukol-Ak et al., 2004), alors que le PACAP38 traverse la BHE *via* un transporteur nommé *peptide transport system-6* (PTS-6) (Banks et al., 1993; Dogrukol-Ak et al., 2004). Le passage du PACAP à travers la BHE, suggère un rôle clé dans certaines atteintes neurologiques même si son passage bidirectionnel pourrait limiter son action neuroprotectrice (Nonaka et al., 2002). Dans ce contexte, il a été montré chez la souris SAMP8, utilisée comme modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer (MA), que le transport du PACAP dans les différentes régions du cerveau comme l'hypothalamus, l'hippocampe et le bulbe olfactif est considérablement plus lent que

chez la souris sauvage (Nonaka et al., 2002). En outre, dans le cas de lésions de la moelle épinière ou d'un accident vasculaire cérébral (AVC), le transport PACAPergique est altéré, suite à une inhibition de l'efficacité du PTS-6 (Banks et al., 1998; Nonaka et al., 2005), conduisant à une réduction de l'apport en PACAP38 au cerveau.

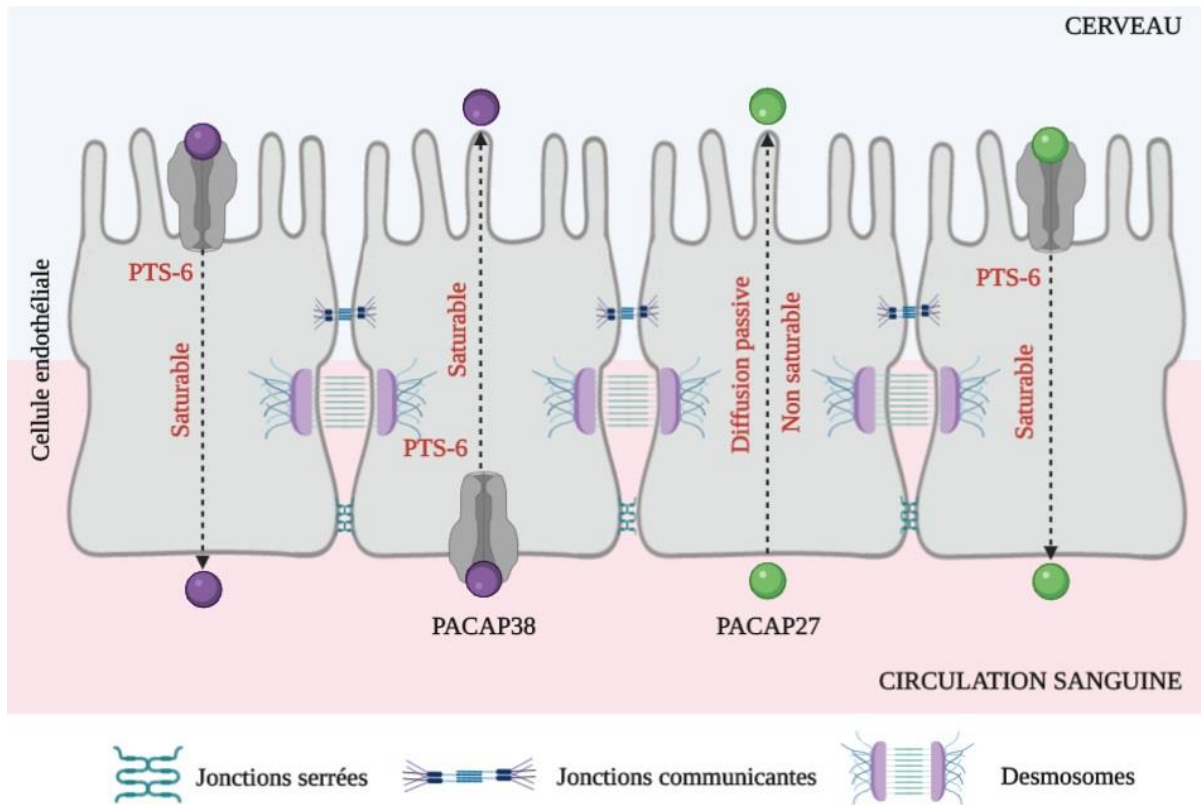


Figure 10 : Passage du PACAP à travers la BHE.

Le passage du PACAP38 se fait principalement par le transporteur saturable PTS-6 de la circulation sanguine au cerveau et inversement du cerveau vers la circulation sanguine. Le PACAP27 traverse la BHE par diffusion passive vers le cerveau et par le transporteur PTS-6 vers la circulation sanguine. Abréviations : PTS-6 : *peptide transport system 6*.

3.4. Dans le système nerveux central

3.4.1. Distribution du PACAP dans le SNC chez l'adulte

Le PACAP exerce de multiples activités biologiques au niveau de l'organisme, et agit en tant qu'hormone hypothalamique, neuromodulateur, facteur neurotrophique ou neurotransmetteur (Shioda, 2000). En accord avec ces multiples fonctions, des dosages radio-immunologiques et des études par hybridation *in situ* ont démontré que le PACAP est largement exprimé dans l'ensemble du SNC des mammifères, sachant que la forme PACAP38 est toujours plus abondante que la forme PACAP27 (Arimura et al., 1991; Condro et al.,

2016; Ghatei et al., 1993). En particulier, le PACAP ainsi que son ARNm sont fortement exprimés dans l'hypothalamus et dans de nombreuses régions extra-hypothalamiques, telles que le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le noyau accumbens, la substance noire, le locus coeruleus, la glande pinéale, le cervelet et le pont (Condro et al., 2016; Ghatei et al., 1993; Hannibal et al., 1995; Masuo et al., 1993; Piggins et al., 1996; Vaudry et al., 2009). Des neurones immunoréactifs au PACAP sont aussi localisés dans la substance grise périaqueducale du mésencéphale (Das et al., 2007).

3.4.2. Distribution du PACAP dans le SNC au cours de l'ontogenèse

La présence du PACAP au cours du développement a été particulièrement étudiée dans le SNC des mammifères et il apparaît que la cinétique d'expression du PACAP coïncide avec celle codant pour ses ARNm (Masuo et al., 1994; Tatsuno et al., 1994). Les quantités d'ARNm du PACAP sont variables au niveau du SNC (hypothalamus, hippocampe, cervelet) et du SNP (neurones sensoriels, neurones sympathiques préganglionnaires et neurones ganglionnaires parasympathiques). Les études immunohistochimiques ont permis de démontrer que le PACAP est exprimé dans le tube neural dès le 9^{ème} et le 11^{ème} jour de vie embryonnaire chez la souris et le rat, respectivement (Shuto et al., 1996; Waschek et al., 1998) suggérant un rôle du peptide dans la prolifération ou la différenciation des précurseurs neuronaux du tube neural (Scharf et al., 2008). Au stade embryonnaire 16 (E16), le PACAP est exprimé au niveau de la moelle épinière en développement. Le PACAP est également présent dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le noyau pontique (Jaworski and Proctor, 2000) dès leur apparition, suggérant un rôle dans l'activation de l'axe hypophyso-thyroidien nécessaire pour la métamorphose de l'embryon (Tata, 1998). Dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et le mésencéphale, le niveau de PACAP augmente rapidement entre le jour postnatal 10 (P10) et P20 chez le rat pour atteindre un plateau vers P30 à la fin de la phase de différenciation des neurones. Dans le striatum et le cervelet, les niveaux de PACAP sont très élevés à la naissance et au cours des premières semaines postnatales puis diminuent progressivement entre P20 et l'âge adulte (Jaworski and Proctor, 2000). Par ailleurs, au niveau du cervelet, le PACAP se caractérise par deux pics immunoréactifs qui sont observés à P4 puis à P20, suggérant une contribution de ce peptide à la neurogenèse puis la survie des cellules neuronales en cours de différenciation.

4. Les Récepteurs du PACAP

Le PACAP peut se lier à deux types de sites de liaison qui se distinguent par leur affinité relative pour le PACAP, le VIP et d'autres peptides de la même famille. Les études pharmacologiques indiquent que les sites de liaison de type I présentent une haute affinité pour le PACAP ($K_d \approx 0,5 \text{ nM}$) mais une affinité beaucoup plus faible pour le VIP ($K_d \approx 500 \text{ nM}$), alors que les sites de type II possèdent une affinité équivalente pour le PACAP et le VIP. Trois sous-types de récepteurs au PACAP ont été clonés à ce jour et nommés PAC1, VPAC1 et VPAC2 (Harmar et al., 1998). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G de type *guanine nucleotide binding proteins* de classe B, qui se distinguent de la classe A par un large hector-domaine dans la partie N-terminale, crucial pour la reconnaissance du ligand (Kumar et al., 2011).

4.1. Les récepteurs PAC1

Les sites de liaison de type I, caractérisés initialement dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus, correspondent au récepteur PAC1 (Harmar et al., 1998). Chez l'Homme, le récepteur PAC1 comporte 495 acides aminés (Vaudry et al., 2009) et le gène codant le PAC1 est composé de 18 exons localisés en 7p15-14 (Brabet et al., 1996). Le gène codant le récepteur PAC1 a été cloné, respectivement, chez l'Homme (Ogi et al., 1993), les bovins (Miyamoto et al., 1994), le rat (Hashimoto et al., 1993) et la souris (Yamamoto et al., 1998b).

La caractérisation du gène codant pour ce récepteur, composé de 18 exons, a révélé qu'il peut générer des isoformes par un mécanisme d'épissage alternatif (Lutz et al., 2006). Les récepteurs PAC1 ont été identifiés comme étant spécifiques du PACAP, puisqu'ils ne lient le VIP qu'à des concentrations 1000 fois supérieures au PACAP. L'activation du récepteur PAC1 entraîne généralement une augmentation de la concentration d'AMPc de par son couplage à l'AC (Basille et al., 1995), et une augmentation des concentrations de diacylglycérol (DAG) ou d'inositoltrisphosphate (IP_3) *via* son couplage à la PLC (Journot et al., 1994) (Figure 9). Mais il peut aussi engendrer une augmentation d'acide phosphatidique *via* son couplage à la phospholipase D (PLD) (McCulloch et al., 2000). La spécificité de couplage du récepteur PAC1 aux différents seconds messagers varie en fonction des variants exprimés.

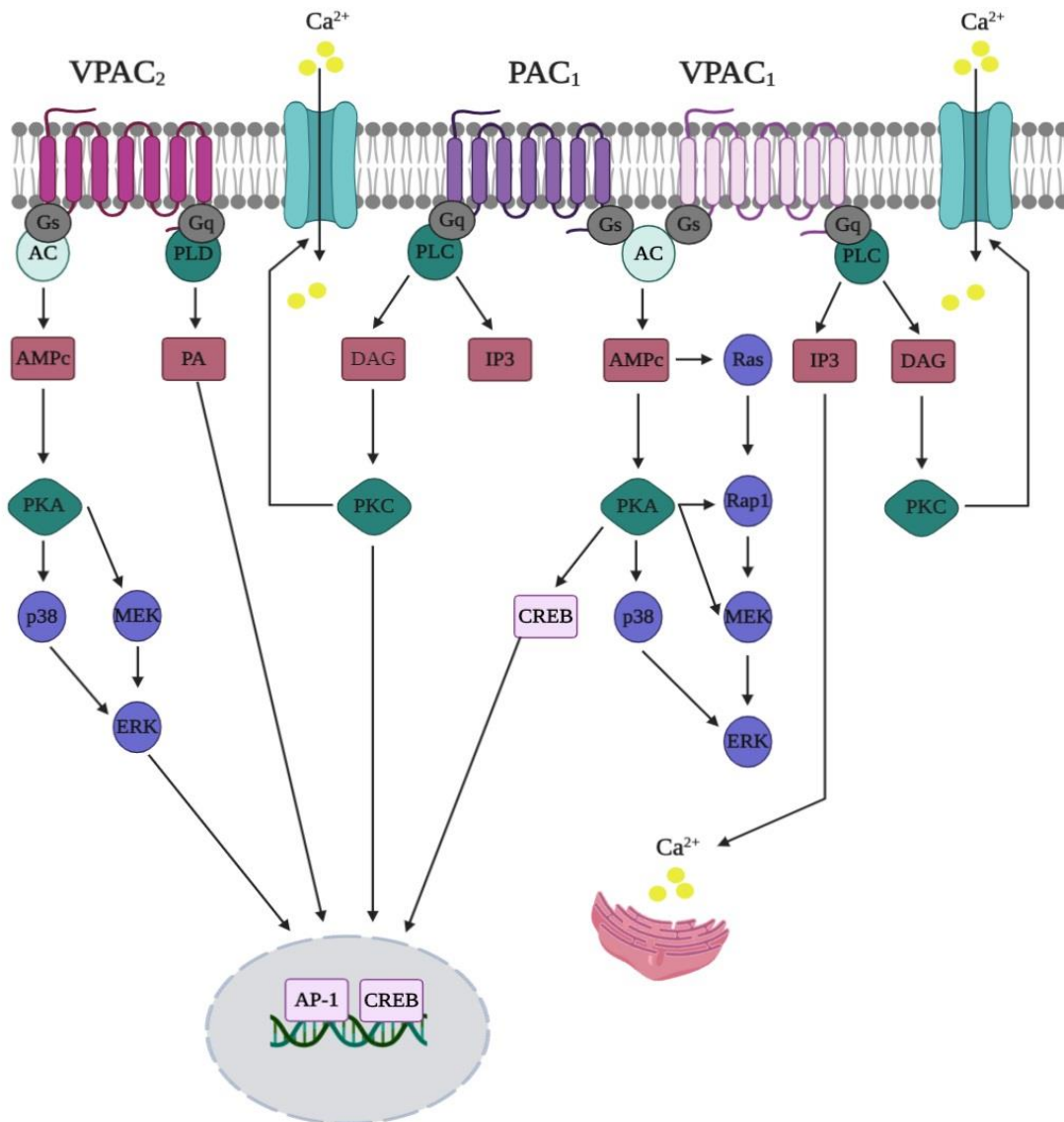


Figure 11 : Voies de transduction activées par les récepteurs du pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP).

Les récepteurs du PACAP, PAC1, VPAC1 et VPAC2 sont couplés positivement à l'AC et leur activation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation subséquente des voies des MAP kinases. Ils peuvent également être couplés à la PLC et activer les voies de l'IP₃ et de la PKC provoquant une accumulation intracellulaire de calcium Ca²⁺ ou à la PLD et activer la voie du PA. Abréviations : AC : adenylyl cyclase ; AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; AP-1 : activator protein 1 ; Ca²⁺, ions calcium ; CREB : cAMP response element binding protein ; DAG : diacylglycérol ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; IP₃ : inositol trisphosphate ; MEK : mitogen-activated protein kinase kinase ; p38 : p38 mitogen-activated protein kinase ; PA : acide phosphatidique ; PAC1 : récepteur spécifique du PACAP ; PKA/C : protéine kinase A/C ; PLC/D : phospholipase C/D ; Rap1, ras-related protein 1 ; Ras : ras oncogene ; VPAC1/2, récepteur de type 1/2 du PACAP et du VIP.

L'épissage alternatif du récepteur de type I, révèle six variants différents les uns des autres par l'absence (forme *short*) ou la présence au niveau de la troisième boucle intracellulaire (IC3) des exons *hip* et/ou *hop* (Spengler et al., 1993). Ces variants ont aussi été identifiés chez l'Homme (Pisegna and Wank, 1996) et les rongeurs (Pantaloni et al., 1996). La forme courte du récepteur est nommée PAC1s, avec « s » pour *short* (sans cassette). Les autres formes du récepteur présentent l'insertion au niveau de la boucle IC3 d'une cassette de 27 acides aminés (variant PAC1hop1), d'une cassette de 28 acides aminés (variants PAC1hip ou PAC1hop2) ou d'une association de cassettes (variants PAC1hip-hop1 et PAC1hip-hop2) (Spengler et al., 1993). L'isoforme PAC1TM4 présente des substitutions et des délétions entraînant des modifications au niveau des domaines transmembranaires (TM) 2 et 4 (Chatterjee et al., 1996). Cette isoforme du récepteur PAC1 n'est couplée ni à la PLC ni à l'AC, mais induit une augmentation de l'entrée d'ions Ca^{2+} via un canal de type L (Chatterjee et al., 1996). Un autre variant, nommé PAC1vs (vs pour « *veryshort* »), est généré par la délétion des exons 5 et 6 (Dautzenberg et al., 1999; Pantaloni et al., 1996). Ces variants identifiés chez le rat ne sont pas tous retrouvés chez l'Homme. En effet, seules les isoformes PAC1s, hip, hop1, hip-hop1 et vs ont été à ce jour rapportées chez l'Homme, où elles sont nommées respectivement null, SV1, SV2, SV3 et VS (pour revue, Vaudry et al., 2000a). D'autres isoformes du récepteur PAC1 présentant à la fois des délétions au niveau des exons 4, 5 et 6 codant l'extrémité N-terminale du récepteur, ainsi que des insertions dans la région codant la boucle IC3 ont été identifiées dans des cellules de neuroblastomes (Lutz et al., 2006).

Certaines études rapportent des différences d'affinité des récepteurs PAC1 entre le PACAP38 et le PACAP27. Ceci a conduit à diviser cette classe de récepteurs en deux sous-types. D'un côté, les récepteurs de type 1A (correspondant aux variants humains null et SV3) présentent une haute affinité pour le PACAP38 et le PACAP27 de l'ordre du nanomolaire, alors que les récepteurs de type 1B (correspondant aux isoformes SV1, SV2 et VS) présentent également une affinité pour le PACAP38 de l'ordre du nanomolaire mais une affinité 100 fois plus faible pour le PACAP27 (Robberecht et al., 1991; Shivers et al., 1991).

4.2. Les récepteurs VPAC1/VPAC2

Les sites de liaison de type II, abondants dans de nombreux organes périphériques, correspondent aux récepteurs nommés VPAC1 et VPAC2. Les profils pharmacologiques de ces deux récepteurs diffèrent surtout en ce qui concerne leur affinité relative pour la sécrétine et l'hélodermine (Vaudry et al., 2000a). Le récepteur VPAC1 a initialement été identifié dans le poumon de rat (Ishihara et al., 1992) et a été par la suite cloné chez l'Homme dans la lignée de carcinome HT29 (Sreedharan et al., 1993). Chez l'Homme, le récepteur VPAC1 comporte 457 acides aminés et le gène codant le VPAC1 est composé de 13 exons localisés en 3p22.3 (Sreedharan et al., 1995). Le récepteur VPAC2, a quant à lui été identifié dans l'hypophyse de rat (Lutz et al., 1993), puis chez l'Homme dans les cellules SUP-T1 (Svoboda et al., 1994). Chez l'Homme, le récepteur VPAC2 comporte 437 acides aminés et le gène codant le VPAC2 est composé de 13 exons localisés en 7q36.3 (Mackay and Cooper, 1996). Le récepteur VPAC1 présente 49% d'homologie avec le récepteur VPAC2. En général, les VPAC1 et VPAC2 sont principalement couplés à l'AC mais peuvent parfois aussi activer la PLC et induire une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Sreedharan et al., 1994) ou stimuler la PLD (McCulloch et al., 2000) (Figure 11).

4.3. Caractérisation pharmacologique des récepteurs du PACAP

La caractérisation des récepteurs du PACAP s'est faite par des études de relations structure activité. En effet, les récepteurs PAC1 et VPAC sont un domaine N-terminal impliqué dans la reconnaissance du récepteur *via* la formation d'un complexe avec le PACAP (Laburthe and Couvineau, 2002). La formation de ce complexe entre la portion hélicoïdale du PACAP et le domaine N-terminal du récepteur induit un changement conformationnel de ce dernier permettant ainsi à la portion N-terminale du PACAP d'interagir avec la région juxta-membranaire du récepteur pour induire, *via* le recrutement des protéines Gas, l'activation de l'AC et donc par conséquent l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPC. Des analogues du PACAP ont été développés en modifiant le fragment C-terminal du PACAP, en générant des peptides chimériques ou en créant des peptides D-énantiomères (pour revue, Dickson and Finlayson, 2009). Certains ligands sélectifs (agonistes ou antagonistes) pour les récepteurs du PACAP actuellement disponibles sont présentés dans le tableau 4.

	Agonistes		Antagonistes	
Récepteur	Peptides	Limitations	Peptides	Limitations
PAC 1	Maxadilan (Moro and Lerner, 1997)	-	des(24-42)Maxadilan (Moro et al., 1999)	-
		-	PACAP(6-38) (Robberecht et al., 1992b)	Faible agoniste VPAC2
		-	Hydrazides (Beebe et al., 2008)	Aucune donnée pour VPAC1 et VPAC2
VPAC1	[A ¹¹ , A ²² , A ²⁸]VIP (Nicole et al., 2000)	-	[Y ⁹ , Dip ¹⁸]VIP(6-23) (Tams et al., 1999)	Affinité moyenne envers VPAC2
	[K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷]VIP (1-7)/GRF (8-27) (Gourlet et al., 1997b)	-	PG 97-269 (Gourlet et al., 1997a)	Faible affinité pour VPAC2
	[R ¹⁶]Sécrétine (Gourlet et al., 1996)	Agoniste du récepteur de la sécrétine		-
VPAC2	Ro 25-1392 (Xia et al., 1997)	-		-
		-	PG 99-465 (Moreno et al., 2000)	Faible agoniste VPAC1
	Ro 25-1553 (O'Donnell et al., 1994)	Activation de PAC1		-

Tableau 4 : Principaux outils pharmacologiques disponibles pour étudier l'implication fonctionnelle des récepteurs PAC1, VPAC1, VPAC2. (Adapté de (Bourgault, 2009)).

Ligands sélectifs du PACAP (agonistes, antagonistes) pour les récepteurs du PACAP avec leurs limites d'utilisation. (-) Absence de limitations.

5. Distribution des récepteurs du PACAP

Globalement, les récepteurs du PACAP sont exprimés dans les mêmes tissus que leurs ligands. Mais même si ces différents récepteurs sont très largement présents dans l'organisme, leur abondance relative diffère. En effet, le récepteur PAC1 est plus abondant dans le SNC et le SNP, alors que les récepteurs VPACs sont majoritaires dans les systèmes respiratoire, cardio-vasculaire, digestif et urogénital (pour revue, Vaudry et al., 2000a).

5.1. Dans les organes périphériques à l'âge adulte

Au niveau périphérique, les trois récepteurs sont abondamment exprimés et leur distribution relative est tissu-dépendante (Busto et al., 2000; Valiante et al., 2009; Vaudry et al., 2000a) (Tableau 5). Les sites de liaison de type I sont notamment retrouvés au niveau des artères, de la médullosurrénale, des tissus lymphoïdes, de l'intestin, de l'hypophyse et des gonades (testicules et ovaires) (Usdin et al., 1994; Vaudry et al., 2000a). Les sites de type II sont retrouvés dans d'autres tissus, mais comme ils correspondent à la fois aux récepteurs VPAC1 et VPAC2, il a fallu confronter ces données avec des études d'hybridation *in situ*. Les ARNm codant pour le récepteur VPAC1 sont particulièrement abondants dans les tissus épithéliaux, les poumons, le foie, les reins, la prostate et la rate (Reubi et al., 2000), alors que les ARNm des récepteurs VPAC2 sont présents en forte densité au niveau de l'hypophyse, des organes musculaires du côlon, du pancréas, de la thyroïde et de la rétine (Harmar et al., 2004).

5.2. Dans le placenta

Les récepteurs VPACs sont faiblement exprimés dans le placenta humain (Sreedharan et al., 1995) alors qu'on y retrouve une expression plus forte du récepteur PAC1 (Koh et al., 2003, 2005). Des études immunohistochimiques, révèlent que le PAC1 est exprimé dans différentes cellules du placenta humain, *i.e.* les cellules du stroma endométrial qui entourent les vaisseaux sanguins, les cellules stromales au niveau des villosités choriales et les cellules déciduales. Chez les rongeurs, le PAC1 est distribué dans la zone du labyrinthe, et au niveau des terminaisons des villosités du sac vitellin (Sreedharan et al., 1995).

L'expression du messenger du récepteur PAC1 augmente progressivement dans les différentes régions placentaires au cours de la gestation chez le rongeur, sauf au niveau de la muqueuse utérine de la caduque. Au niveau des cellules déciduales le niveau d'expression du messenger du PAC1 atteint un pic d'expression à E13, puis son expression se stabilise jusqu'à la naissance. Chez la femme, l'expression du récepteur PAC1 varie selon la région placentaire. Une expression élevée du PAC1 est détectée au niveau des cellules stromales et des villosités placentaires, alors que l'expression est nettement plus faible au niveau des cellules du trophoblaste (Koh et al., 2005). L'augmentation progressive de l'expression des messagers, à la fois du PACAP et de son récepteur PAC1, suggère son rôle important dans le développement et la croissance du placenta. Cinq isoformes du récepteur PAC1 ont été

détectés chez le rat, *i.e.* lePAC1s, le PAC1hip, le PAC1hop1, le PAC1hip-hop1 et le PAC1vs, alors que chez la femme, seul le variant PAC1 SV1 a été rapporté.

Structures	PACAP			Récepteurs		
	ARNm	Corps cellulaires	Fibres	PAC1	VPAC1	VPAC2
SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE						
Ganglions cardiaques	+	+	+	+		
Ganglions de la racine dorsale	+	+	++			
Ganglions parasymphatiques	++	++				
Moelle épinière	++		+			
Ganglions cervicaux supérieurs	+	+ / ++	++	++ / +++	-	-
Ganglions trijumeaux	+	++	+			
SYSTEME CARDIOVASCULAIRE						
Artères				+		
Cœur				-		
Vaisseaux sanguins cardiaques			+			+
GLANDES ENDOCRINES						
Hypophyse	- / +	- / ++	++	++ / +++		+ / ++
Glande surrénale	+	- / +	- / +	- / ++	+ / ++	+ / ++
Pancréas endocrine		++	++	+	++	+
SYSTEME REPRODUCTEUR						
Glandes mammaires			++			
Testicules	++	- / +++		- / ++	- / +	+ / ++
Ovaires	+		+	+	-	+ / ++
Placenta	++			++		
Utérus	++					
SYSTEME RESPIRATOIRE						
Larynx			++			
Poumons			++	+	++	+
Nez			++			
Langue			++			
Bronches			++		+	+
SYSTEME DIGESTIF						
Pancréas exocrine			++			+
Intestin	+	++	+ / ++		++	
Estomac					-	+
Tractus urinaire		-	++		+	+
SYSTEME IMMUNITAIRE						
Moelle osseuse		+				
Muqueuse duodénale		+				
Ganglions lymphatiques		++				
Macrophages péritonéaux		+		+	+	- / +
Rate		++			-	+ / ++
Thymus		+		+	++	+
Peau			++			

Tableau 5 : Localisation et abondance relative du neuropeptide PACAP et de ses récepteurs dans différents organes périphériques.

Les symboles indiquent les niveaux relatifs d'expression des ARNm ou de signal d'immunofluorescence détectés au niveau des corps cellulaires ou des fibres marqués avec des sondes nucléotidiques ciblant le PACAP et ses récepteurs, ou un anticorps anti-PACAP38. - absence de détection ; + expression faible ; ++ expression modérée ; +++ forte expression. (Adapté de (Vaudry et al., 2009)).

5.3. Dans le SNC adulte

Au niveau du SNC, les sites de liaison de type I sont généralement plus abondants et leur distribution est moins restreinte que celle des sites de type II. En effet, l'expression de l'ARNm du récepteur PAC1 a été démontrée dans le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cortex cérébelleux, ainsi que dans l'hypothalamus, l'amygdale, le thalamus et la substance noire (Dickson and Finlayson, 2009; Hashimoto et al., 1993, 1996; Jolivel et al., 2009; Vaudry et al., 2000a). En revanche, l'expression des sites de liaison VPACs est plus restreinte avec un peu de VPAC1 retrouvé dans le cortex piriforme, le cortex cérébral, le gyrus denté, le noyau amygdalien latéral, le plexus choroïde ou encore la glande pinéale (Vaudry et al., 2000a), et un peu de VPAC2 dans le cortex cérébral, le noyau périventriculaire, le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale (Dickson and Finlayson, 2009; Jolivel et al., 2009). Les variants d'épissage majoritairement exprimés dans le cerveau sont les isoformes PAC1s et PAC1hop1 (Zhou et al., 2000, 1999).

Au niveau cellulaire, les trois types de récepteurs du PACAP sont retrouvés dans les neurones, les cellules microgliales et les astrocytes (Suzuki et al., 2003), contrairement aux oligodendrocytes qui n'expriment que le récepteur PAC1 (Joo et al., 2004; Tatsuno et al., 1990).

5.4. Ontogenèse des récepteurs du PACAP

Les sites de liaison du PACAP sont largement distribués dans le SNC au cours du développement (Basille et al., 1994, 2000a). Chez les rongeurs, le récepteur PAC1 est détecté dès E9,5 puis sa densité augmente progressivement dans les zones germinatives au cours du développement, jusqu'à atteindre un plateau vers P30 (Sheward et al., 1996; Tatsuno et al., 1994). A E14, le PAC1 est distribué dans le neuroépithélium médullaire et à partir de E17 dans l'amygdale ou l'hippocampe (Basille et al., 1994, 2000a; Jaworski and Proctor, 2000; Zhou et al., 1999). Au niveau du cervelet, les récepteurs PAC1 sont exprimés au niveau de la couche granulaire externe (CGE), puis détectés dans la couche moléculaire (CMol) et au niveau de la couche granulaire interne (CGI) à partir de P8. L'expression dans la CGE va progressivement décroître puis s'éteindre à P25 avec la disparition progressive de cette assise germinative secondaire (Basille et al., 1994). Parallèlement à cela, à P10, le PAC1 est fortement exprimé dans la région de neurogenèse du courant migratoire rostral, c'est-à-dire de la zone sous-ventriculaire apicale au bulbe olfactif (Matsuno et al., 2008).

Les récepteurs VPACs sont également retrouvés dans le SNC au stade embryonnaire et leur densité diminue au cours du développement (Roth and Beinfeld, 1985). Bien que le VPAC1 soit exprimé à des niveaux plus faibles, la distribution de son ARNm présente des similitudes avec celle du PAC1. Le récepteur VPAC1 est surtout exprimé dans le neuroépithélium bordant les ventricules entre la deuxième semaine de vie embryonnaire et la naissance (Basille et al., 2000a; Pei, 1997). Parallèlement, la présence des ARNm codant le récepteur VPAC2 a été détectée dans le cerveau de souris dès E14 (Waschek et al., 1996). A partir du E21, le VPAC2 est principalement détecté dans l'hypothalamus et le thalamus (Basille et al., 2000a). Des analyses par PCR quantitative ont révélé la présence des récepteurs PAC1 et VPAC1 au niveau des CGE et CGI du cortex cérébelleux dès E15 chez l'Homme (Basille et al., 2006). L'expression de ces récepteurs est constante au cours de la période fœtale et se maintient jusqu'à l'âge adulte (Basille et al., 2006). En revanche, le profil de distribution du VPAC2 est assez différent, puisqu'il n'est pas détecté dans le tube neural (Sheward et al., 1996), mais plutôt présent dans les zones non-germinatives telles que le noyau suprachiasmatique (Basille et al., 2000b).

L'expression précoce du PACAP ainsi que des récepteurs PAC1 et VPAC1 dans de nombreuses structures cérébrales dès l'âge embryonnaire, suggère que le système PACAPergique joue un rôle crucial dans l'histogenèse du SNC. En outre, l'expression du PACAP et de ses récepteurs dans les zones de neurogenèse pendant le développement embryonnaire et postnatal, et sa persistance à l'âge adulte, suggère que ce peptide possède des activités neurotrophiques et neuroprotectrices au cours du développement embryonnaire.

6. Activités biologiques du PACAP

Le développement du SNC met en jeu des processus de prolifération, migration et différenciation. La présence de concentrations élevées de PACAP et de ses récepteurs dans les zones germinatives du cerveau dès la vie embryonnaire, suggère que ce peptide exerce des fonctions importantes au cours de l'ontogenèse en modulant par exemple la prolifération, la migration, la différenciation et/ou la survie des précurseurs neuronaux ou en participant au processus d'angiogenèse.

6.1. Effet du PACAP sur le développement embryonnaire extracérébral

Au cours de la gestation, les ARNm codant le neuropeptide PACAP ainsi que le récepteur PAC1 sont colocalisés au niveau du placenta et leurs niveaux d'expression

augmentent au cours de la grossesse (Koh et al., 2003, 2005), indiquant que le neuropeptide joue un rôle important pendant le développement. Des études par RT-PCR montrent un pic d'expression du PACAP et du facteur de croissance *heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)* chez des embryons de souris à E4 (Somoskői et al., 2020), suggérant que le PACAP peut participer à la croissance embryonnaire. Après la période de gestation, le neuropeptide PACAP est retrouvé dans les glandes mammaires et le lait maternel, plus particulièrement dans le colostrum, suggérant un rôle important de ce neuropeptide non seulement au cours de l'embryogenèse mais également dans le développement du nouveau-né (Csanaky et al., 2012).

Les souris déficientes pour le gène du PACAP présentent un poids significativement inférieur aux souris sauvages et une mortalité importante lors des trois premières semaines de vie postnatale, imputable à un contrôle défectueux de la respiration, une augmentation du taux d'acides gras, une sensibilité accrue à l'insuline et un défaut d'adaptation thermique (Cummings et al., 2008; Gray et al., 2001; Hashimoto et al., 2001; Tanaka et al., 2004; Tomimoto et al., 2008).

Le VIP a été détecté chez l'embryon de souris dès E9 bien que l'ARNm codant le VIP ne soit exprimé qu'à partir de E12, c'est-à-dire après l'étape critique durant laquelle le VIP régule la croissance embryonnaire. Ces données suggèrent que la source du VIP fœtal avant le stade E12, qui participerait à la croissance embryonnaire, serait le VIP maternel en traversant la barrière placentaire (Spong et al., 1999). De plus, le VIP stimule la croissance d'embryons de souris explantés. Ceci se caractérise par un accroissement du volume embryonnaire, une augmentation du nombre de somites et une activité mitotique accrue (Gressens et al., 1993; Hill et al., 1999). A l'inverse, l'administration d'un antagoniste du VIP durant la période embryonnaire (de E9 à E11), entraîne un retard de croissance et une microcéphalie ; mais à des stades plus tardifs de la gestation, l'antagoniste n'a pas d'effets (Gressens et al., 1994). Le VIP favorise également la croissance des tissus périphériques chez l'embryon *via* ses récepteurs VPACs. En effet, le récepteur VPAC2 stimule la prolifération des cellules souches épithéliales du pancréas au cours du développement embryonnaire entre le stade E12 et E16, probablement par une activation de la voie AMPc (pour revue, Rachdi et al., 2003).

6.2. Rôle du PACAP dans le développement du SNC

6.2.1. Effets du PACAP sur l'angiogénèse

Le PACAP joue un rôle essentiel dans l'angiogénèse au cours du développement embryonnaire. En effet, ce peptide peut être considéré comme un modulateur de facteurs pro-angiogéniques puisqu'il stimule l'expression du VEGF dans les cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse de rat (Gloddek et al., 1999). Parmi les nombreux facteurs régulant l'angiogénèse et la maturation vasculaire, le VEGF semble être un acteur clé au niveau cérébral. La régulation de l'expression du VEGF est médiée par les récepteurs VPAC1 et la voie AMPc/PKA dépendante (Collado et al., 2007).

Ces propriétés pro-angiogéniques du PACAP ont été confirmées chez l'adulte puisque dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) chez le rat, le traitement par le PACAP durant 5 jours après ischémie, conduit à une revascularisation accompagnée par une élévation du nombre des vaisseaux sanguins cérébraux par rapport aux animaux contrôles (Shin et al., 2008). Également, il a été démontré que le PACAP accroît le nombre de vaisseaux sanguins et augmente le débit sanguin cérébral dans la région ischémique du cortex d'animaux traités par le PACAP, confirmant que ce peptide peut être considéré comme un puissant facteur angiogénique après un AVC (Lin et al., 2015). La capacité du VIP à stimuler l'angiogénèse a également été rapportée et cela se fait en augmentant l'expression du VEGF notamment dans des cancers prostatiques, pulmonaires et mammaires (Ribatti et al., 2007; Valdehita et al., 2007).

6.2.2. Effets du PACAP sur la prolifération des neurones

En fonction du type cellulaire étudié, le PACAP exerce des effets opposés sur la prolifération neuronale (Meyer, 2006). En particulier, l'administration de PACAP chez la souris stimule la prolifération des progéniteurs neuronaux dans la zone subventriculaire (Watanabe et al., 2016) et le ventricule latéral du gyrus denté (Mercer et al., 2004) ou augmente l'épaisseur du cortex cérébelleux (Vaudry et al., 1999). A l'inverse, chez des souris dont le gène du PACAP a été invalidé, la survie des cellules nouvellement divisées dans le gyrus denté ou l'hippocampe est fortement réduite (Ago et al., 2011). Néanmoins, cet effet sur la prolifération semble dépendre des variants d'épissage exprimés par chaque type cellulaire (Meyer, 2006). En effet, le PACAP stimule la prolifération des neuroblastes sympathiques des ganglions supérieurs cervicaux qui expriment la forme « hop » du récepteur PAC1 couplée à l'AC et à la PLC (Lu et al., 1998) alors qu'il diminue la prolifération des précurseurs des

neurones corticaux qui expriment la forme « short » couplée uniquement à la voie de l'AMPC (Lu and DiCicco-Bloom, 1997; Lu et al., 1998). Or, la transfection du variant « hop » dans ces neuroblastes corticaux conduit à l'activation de la PLC et transforme l'effet anti-prolifératif en un signal pro-mitogène (Nicot and DiCicco-Bloom, 2001).

Il est important de noter que l'effet mitogène du PACAP varierait selon le stade du développement embryonnaire. Chez la souris, le cortex cérébral se forme E10,5 et E17,5. Or une étude récente montre qu'il existe un switch développemental des variants du récepteur PAC1 vers E11 (Yan et al., 2013). En effet, le PACAP stimule la prolifération des précurseurs dans le cortex de souris entre E9,5 et E10,5. Ceci est dû à l'activation de la forme PAC1hop dont l'expression est 24 fois supérieure à la forme PAC1s à ce stade. Cependant, à E14,5 lorsque la forme short est 15 fois plus exprimée que la forme hop, alors le PACAP inhibe la prolifération. Ces données suggèrent que le PACAP contrôle temporellement la corticogénèse en fonction des variants de son récepteur PAC1 (Yan et al., 2013). Ces observations sont en accord avec l'action inhibitrice du PACAP sur les neuroblastes corticaux issus de souris à E13,5, ainsi qu'avec la réduction de la neurogenèse induite par l'injection de PACAP dans l'espace télencéphalique ventriculaire de souris à E13,5 (Lu and DiCicco-Bloom, 1997; Ohtsuka et al., 2008).

L'action pro-mitogène du PACAP est observée sur les cellules souches neurales à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, le nombre de cellules BrdU positives s'élève à la suite du traitement par le PACAP de progéniteurs neuraux en culture issus de souris à E9,5 (Mercer et al., 2004; Ohta et al., 2006; Yan et al., 2013), de même qu'au niveau des zones neurogéniques suite à une injection ICV de PACAP (Ohta et al., 2006; Scharf et al., 2008). Le PACAP retarde la myélinisation des précurseurs d'oligodendrocytes (Lee et al., 2001; Waschek et al., 1998), et à des doses inférieures au nanomolaire, il stimule la prolifération astrocytaire, alors qu'à des concentrations plus fortes, il exerce un effet inhibiteur (Hashimoto et al., 2003; Meyer, 2006; Moroo et al., 1998). Ces effets mitogènes importants du PACAP au cours des stades précoces du développement du SNC confirment son rôle potentiel pour stimuler la neurogenèse endogène.

6.2.3. Effets du PACAP sur la migration des neurones

Des études réalisées *in vitro* et *ex vivo* sur des tranches organotypiques ont montré que le PACAP réduit la mobilité des cellules en grain en culture (Cameron et al., 2007; Falluel-Morel et al., 2006). En effet, il a été démontré qu'une concentration élevée du récepteur PAC1 est présente dans la CGE du cervelet pendant les deux premières semaines de vie postnatale,

une période intense de multiplication et de migration des cellules granulaires (Basille et al., 2000b; Zhou et al., 1999). Plusieurs observations suggèrent que le PACAP libéré par les cellules de Purkinje entraîne, par augmentation de l'AMPc, un arrêt transitoire de la migration des neurones en grain immatures. L'augmentation de l'AMPc diminue les oscillations calciques connues pour favoriser la motilité des neuroblastes cérébelleux (Cameron et al., 2007; Komuro and Rakic, 1992). Cette pause de 2 heures induite par le PACAP serait nécessaire pour la différenciation et/ou l'intégration correcte des neurones en grain au niveau de la CGI. En effet, lors de cette pause, le PACAP induit la synthèse de protéases comme le *tissue plasminogen activator* (tPA), qui en dégradant la matrice extracellulaire favorisent la migration des neurones en grain au sein de la CGI (Raoult et al., 2014). De plus, le PACAP inhibe la mobilité cellulaire au cours du développement et réduit le nombre de progéniteurs impliqués dans la phase S du cycle cellulaire à partir de E13,5 (Suh et al., 2001). Parallèlement, il a été montré que le gène *Zac1*, régulateur de la croissance embryonnaire (Varrault et al., 2006), ralentit fortement la migration entre E14,5 et E18,5 *via* la transcription du récepteur PAC1 au niveau du cortex cérébral (Adnani et al., 2015).

6.2.4. Effets du PACAP sur la différenciation des neurones

Il est à présent bien établi que le PACAP stimule la différenciation de nombreux types cellulaires, comme les cellules souches embryonnaires (Cazillis et al., 2004), les progéniteurs neuronaux (Nielsen et al., 2004), les neuroblastes corticaux (Lu and DiCicco-Bloom, 1997), les cellules en grain du cervelet (Gonzalez et al., 1997) et les oligodendrocytes (Lelievre et al., 2006). L'action neurotrophique du PACAP est observée sur plusieurs autres types cellulaires tels que les cellules en grain du cervelet (Gonzalez et al., 1997) et les cellules de la lignée PC12 issues de phéochromocytomes de rat (Ravni et al., 2008). Pour ce qui concerne les neurones, cela s'accompagne d'une augmentation du nombre et de la longueur totale des prolongements (Gonzalez et al., 1997). Des analyses avec des animaux invalidés pour le gène du PACAP montrent que le peptide retarde le processus de myélinisation donnant plus de temps au développement des axones et à la formation des synapses (Vincze et al., 2011).

Pendant la période d'intense neurogenèse qui se déroule entre E13 et E14,5 chez l'embryon de souris, le PACAP favorise une différenciation vers un lignage neuronal (Lu and DiCicco-Bloom, 1997). Cependant, plus tard vers E17, une période d'intense gliogenèse chez le rongeur, le PACAP induit une différenciation vers un lignage astrocytaire. De nombreux travaux *in vitro* rapportent ces effets pro-différenciateurs du PACAP vers un phénotype neuronal ou astrocytaire. Le PACAP prévient la dépolymérisation de la tubuline, qui est une

protéine impliquée dans le déplacement des corps cellulaires (Falluel-Morel et al., 2005; Lambert de Rouvroit and Goffinet, 2001). Par exemple, le traitement des neurones cérébelleux immatures en culture par du PACAP augmente le nombre de neurites par cellule ainsi que la longueur totale des prolongements neuronaux suite à la réorganisation de l'actine impliquée dans l'initiation dendritique au niveau du cône d'émergence des neurites et à la redistribution de tubuline tout le long des prolongements neuronaux en formation (Falluel-Morel et al., 2005). Inversement, le traitement de précurseurs corticaux issus d'embryons de souris à E17 par du PACAP augmente significativement le nombre de cellules exprimant la GFAP (Vallejo and Vallejo, 2002). Le PACAP peut aussi induire la différenciation neuronale de façon indirecte en stimulant la synthèse de neurotrophines comme le BDNF (Pellegrini et al., 1998).

Les voies de transduction impliquées dans la différenciation sont liées à l'augmentation de la production d'AMPc *via* le récepteur PAC1 qui active ensuite la PKA et conduit à la phosphorylation du facteur de transcription *cAMP response element-binding protein* (CREB) (McIlvain et al., 2006; Zhou et al., 2001). Parallèlement à la voie de CREB, les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) jouent aussi un rôle clé puisqu'elles contribuent à la polymérisation des microtubules en provoquant la phosphorylation de la protéine Tau (Goedert et al., 1997) et qu'elles interviennent dans les cascades d'activation engendrées par le PACAP (Falluel-Morel et al., 2004). Associé au mécanisme de différenciation, l'activation de la forme « short » du récepteur PAC1 par un gradient de PACAP, à proximité d'un cône de croissance d'une cellule en culture, exerce un effet chemoattracteur, suggérant que le PACAP attire les cônes axoniques embryonnaires vers leurs cibles (Guirland et al., 2003). L'activation de la voie AC/AMPc est requise dans cet effet mais une stimulation excessive de l'AC peut finir par inhiber la différenciation (Guirland et al., 2003).

6.2.5. Effet du PACAP sur la survie des neurones

De nombreuses études démontrent que le PACAP exerce un puissant effet neuroprotecteur face à différents agents neurotoxiques ou dans certaines maladies neurodégénératives. Au cours du développement, le PACAP atténue l'excitotoxicité induite par du glutamate sur des neurones corticaux en culture (Morio et al., 1996) ou réduit l'apoptose des neurones en grain du cervelet au cours du développement (Vaudry et al., 2000b). Également, le PACAP contrecarre l'effet toxique d'un stress oxydatif induit par un traitement à l'H₂O₂ dans les cellules en grain du cervelet ou dans les astrocytes en culture (Masmoudi-Kouki et al., 2011; Vaudry et al., 2002a) et préserve leur morphologie. Le

PACAP agit en inhibant l'action délétère du stress oxydatif sur le potentiel membranaire des mitochondries, ce qui empêche l'activation de la cascade apoptotique (Vaudry et al., 2002a). Un effet neuroprotecteur du PACAP a aussi été rapporté dans des modèles animaux d'exposition périnatale à l'éthanol (Botia et al., 2011). Néanmoins le système PACAPergique n'a peut-être pas que des effets bénéfiques au cours du développement puisqu'une surexpression du gène PAC1 humain chez la souris provoque une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose à l'origine d'une hydrocéphalie sévère (Lang et al., 2006).

6.3.Effets neuroprotecteurs du PACAP à l'âge adulte

Au niveau du cerveau adulte, le PACAP semble exercer une action neuroprotectrice puissante capable d'atténuer les dommages neuronaux provoqués par diverses atteintes et il pourrait même restaurer certaines voies nerveuses endommagées. *In vitro*, le PACAP protège les cellules nerveuses face à des agents toxiques tels que la β -amyloïde (Onoue et al., 2002; Wang et al., 2005), le 4-HNE (Ito et al., 1999), les lipopolysaccharides (LPS)(Shintani et al., 2005), la 6-hydroxydopamine (Takei et al., 1998), la roténone (Wang et al., 2005), le 1-méthyl-4-phényl pyridinium (MPP⁺)(Chung et al., 2005), le PrP fragment 106-126 de la protéine prion humaine (Onoue et al., 2002), le cisplatine (Aubert et al., 2008) ou la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (Brenneman et al., 2002). Le PACAP atténue aussi l'activation des cellules microgliales en condition de stress telle que l'hypoxie (Suk et al., 2004).

La capacité du PACAP à protéger les neurones de la région CA1 de l'hippocampe des conséquences d'une ischémie expérimentale chez le rat a été mis en évidence dès 1996 (Uchida et al., 1996). Depuis, l'effet neuroprotecteur du PACAP a été rapporté dans *i*) des modèles de pathologies neurodégénératives tels que la maladie de Huntington (Cabezas-Llobet et al., 2018; Tamás et al., 2006), la maladie de Parkinson (Reglodi et al., 2004) ou la maladie d'Alzheimer (Rat et al., 2011), *ii*) plusieurs modèles d'ischémie cérébrale (Dejda et al., 2011; Reglodi et al., 2000) et *iii*) certains dommages traumatiques (Farkas et al., 2004). Dans les modèles de la maladie de Parkinson, le PACAP provoque généralement aussi une amélioration des déficits moteurs (Reglodi et al., 2004), dans les modèles d'ischémie cérébrale, il facilite la récupération des déficits sensorimoteurs (Chen and Tzeng, 2005; Reglodi et al., 2002) et chez les animaux ayant subi un trauma, il réduit les déficits fonctionnels (Farkas et al., 2004).

Le PACAP est efficace non seulement lorsqu'il est administré par voie ICV (Masuo et al., 1995) mais aussi par voie intraveineuse après occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Reglodi et al., 2000) ou par voie intranasale dans les modèles de maladie d'Alzheimer, de Huntington ou d'ischémie cérébrale (Reglodi et al., 2004; Tamás et al., 2006). De plus, le PACAP exerce son effet neuroprotecteur à faible dose (Dohi et al., 2002; Tamás et al., 2002). Le PACAP endogène contribue également à la protection des neurones puisque dans les modèles de lésions, les souris dont le gène codant pour le PACAP a été invalidé présentent des atteintes cérébrales et des déficits fonctionnels accrus. Par exemple, après une ischémie cérébrale, les souris PACAP *knockout* (KO) présentent un volume d'infarctus plus important que les animaux sauvages (Ohtaki et al., 2006).

6.3.1. Mécanismes des effets neuroprotecteurs du PACAP

Le PACAP exerce son effet neuroprotecteur en inhibant la cascade apoptotique. L'effet neuroprotecteur du PACAP passe généralement par le récepteur PAC1, puisque le VIP aux mêmes concentrations n'exerce souvent que peu ou pas d'effet(s) (Vaudry et al., 2002a). L'activation du récepteur PAC1 provoque une augmentation d'AMPC, laquelle conduit à l'activation de la PKA, des *exchange proteins activated by cAMP* (EPAC), de la MAPK ou encore la phosphorylation de CREB (Dejda et al., 2008). L'activation de la PKA induit la phosphorylation des MAP kinases ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) et leur translocation nucléaire, stimulant l'expression de la protéine c-fos (Aubert et al., 2006; Vaudry et al., 1998). Le facteur AP-1 résultant de la dimérisation de c-fos avec c-jun induit l'expression de la protéine anti-apoptotique *B-cell lymphoma2* (Bcl-2) (Aubert et al., 2006; Falluel-Morel et al., 2004) permettant le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale et empêchant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Falluel-Morel et al., 2004; Ohtaki et al., 2006). Le neuropeptide PACAP s'oppose ainsi aux effets de protéines pro-apoptotiques comme la protéine *Bcl-2-associated X* (Bax) activée dans plusieurs types cellulaires suite entre autres à un stress oxydatif (Mester et al., 2011; Shioda et al., 2006). Le PACAP entraîne un blocage de toute la voie apoptotique mitochondriale en inhibant l'activité de la caspase-9 puis celle de la caspase-3 dans de nombreux modèles de lésions cérébrales où l'activité de ces enzymes est augmentée (Bourgault et al., 2009a, 2009b; Wolf and Kriegstein, 1995).

De plus, certains effets anti-apoptotiques du PACAP impliquent la cascade de signalisation phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt, une voie également couplée au récepteur PAC1 qui agit en synergie avec la voie de la PKA, mais indépendante de l'AMPC

(Bhave and Hoffman, 2004). L'activation de la protéine kinase Akt induit la phosphorylation de Bad et sa liaison avec la protéine afin d'empêcher son activité pro-apoptotique et bloquer la mort cellulaire (Downward, 1999; Rácz et al., 2008). Certains variants du récepteur PAC1 activent également la PKC *via* la voie de la PLC et cela renforce l'inhibition de la caspase-3 (Vaudry et al., 2002a). A côté des effets directs du PACAP sur la cascade apoptotique intrinsèque, le peptide peut aussi exercer un effet indirect en induisant l'expression de nombreux facteurs de survie cellulaire par les neurones et les cellules gliales. En particulier, le PACAP stimule l'expression et/ou la libération du BDNF, du NGF, de la NT-1, NT-3, NT-4 (Somogyvári-Vigh and Reglodi, 2004) et de *l'activity-dependent neurotrophic protein* (ADNP)(Li et al., 2005; Nakamachi et al., 2006; Zusev and Gozes, 2004). En plus d'augmenter la production de ces facteurs de croissance, le PACAP stimule aussi souvent l'expression de leurs récepteurs. Toutes ces données illustrent la capacité du PACAP à bloquer l'apoptose suite à un stress ou une lésion cérébrale et montrent la diversité des mécanismes sur lesquels peut agir ce peptide.

6.3.2. Effets du PACAP sur la neuro-inflammation

Outre son action directe sur l'apoptose, le PACAP agit également sur des mécanismes comme la réponse inflammatoire qui souvent exacerbent la mort neuronale. En particulier, le PACAP stimule la libération de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL10 et inhibe celle de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α ou l'IL-1 β , au niveau de cellules neuronales ou astrocytaires en culture (Delgado and Ganea, 2003). Des études révèlent que la capacité du PACAP à contrecarrer les effets pro-inflammatoires du LPS sur des cellules microgliales passe par l'inhibition de la libération de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12 et d'oxyde nitrique (NO) suite à l'activation du récepteur VPAC1 (Delgado and Ganea, 2003). Un tel effet anti-inflammatoire neuroprotecteur fut également observé sur des neuroblastomes humains SH-SY5Y incubés dans un milieu conditionné de monocytes exposés à une combinaison de LPS et d'interféron- γ (Brown et al., 2014).

Il a été également montré que le PACAP réduit le processus inflammatoire dans différents modèles animaux (Martinez et al., 2002). Après ischémie cérébrale, le PACAP agirait surtout en redirigeant la réponse inflammatoire d'un phénotype délétère Mi1 vers un phénotype protecteur Mi2 plutôt qu'en bloquant cette réponse inflammatoire. En outre, l'utilisation de souris IL-6 KO, suggère que l'effet neuroprotecteur du PACAP suite à une ischémie cérébrale impliquerait cette interleukine (Ohtaki et al., 2006). Ces observations

suggèrent que le PACAP agit de façon concomitante et synergique sur plusieurs processus cellulaires pour maintenir la survie neuronale en cas de lésion cérébrale.

6.4.Effets du PACAP sur le comportement

6.4.1. Impact des effets du PACAP sur le comportement au cours du développement

Plusieurs données cliniques, suggèrent qu'une mauvaise expression au cours du développement du PACAP et de ses récepteurs pourrait être responsable de troubles comportementaux. En particulier, des perturbations au niveau des régions chromosomiques contenant le locus du PACAP et du PAC1 sont associées à des problèmes neurologiques, tels que la microcéphalie (Wu et al., 1997). De plus, le locus 18p11 où se situe le gène codant pour le PACAP est lié à une sensibilité accrue à plusieurs maladies neurologiques telles que la trisomie 18 (Salihu et al., 1997), une hydrocéphalie (Takeda et al., 1989) ou la schizophrénie (Hashimoto et al., 2007).

Des mutations des régions chromosomiques contenant le locus des récepteurs du PACAP conduisent aussi à des troubles du comportement. A titre d'exemple, un patient diagnostiqué pour une duplication 7p15 où se trouve le locus du récepteur PAC1, présentait un retard mental et une hydrocéphalie (Miller et al., 1979). Egalement, une personne présentant une holoprosencéphalie associée à des troubles neurologiques présentait des réarrangements chromosomiques des gènes codant le PACAP et le VPAC2 (Mackay and Cooper, 1996). Le traitement de souris gestantes par du VIP inhibe la survenue de la microgyrie induite par une excitotoxicité à l'ibotenate (Gressens et al., 1997), montrant le rôle des récepteurs VPACs dans la protection du cerveau au cours du développement. L'ensemble de ces données suggère qu'une dérégulation de l'expression du PACAP et/ou de ses récepteurs au cours du développement a des conséquences sur le comportement à l'âge adulte.

6.4.2. Effets du PACAP sur le comportement à l'âge adulte

Il a été démontré que le PACAP peut influencer plusieurs aspects comportementaux tels que le rythme circadien (Kawaguchi et al., 2003) et l'appétit (Masuo et al., 1993). En effet, la forte expression du récepteur PAC1 dans la glande pinéale stimule notamment l'expression de la mélatonine chez le rat (Nowak et al., 1999; Simonneaux et al., 1993), interagit avec le glutamate pour moduler l'horloge circadienne (Chen et al., 1999) et synchronise l'horloge biologique avec la phase diurne (Lindberg et al., 2019). De plus, une augmentation de la

concentration du PACAP a été observée dans l'hypothalamus, le télencéphale et le tronc cérébral de rat privé de nourriture (Kiss et al., 2007). Cet effet anorexigène du PACAP passerait principalement par le récepteur PAC1 (Mounien et al., 2009).

L'implication du PACAP dans l'apprentissage a été mise en évidence à l'aide de souris invalidées pour le PAC1, qui présentent un déficit d'apprentissage associatif en condition d'anxiété, sans cependant qu'aucun déficit d'apprentissage déclaratif ne soit détecté en piscine de Morris (Otto et al., 2001). D'autre part, il a été mis en évidence qu'un stress chronique entraîne une élévation d'ARNm du PACAP et du PAC1 dans des régions cérébrales associées à l'anxiété (Hammack et al., 2009; Mustafa, 2013; Ramikie and Ressler, 2016). Il a aussi été montré que les patients diagnostiqués pour un trouble de stress post-traumatique ont des hauts niveaux sanguins de PACAP et un polymorphisme nucléotidique au niveau du gène PAC1 corrélé avec l'apparition d'un syndrome de stress post-traumatique, en particulier chez la femme (Ressler et al., 2011). En outre, la mémorisation et l'apprentissage se trouvent faciliter par l'injection ICV de PACAP chez le rongeur, démontrant ainsi l'implication du système PACAPergique dans ce processus (Adamik and Telegdy, 2005). En lien avec cela, il a été mis en évidence que le niveau d'expression du PACAP est plus faible dans le liquide céphalorachidien, le gyrus frontal supérieur et le gyrus temporal moyen de patients diagnostiqués pour une maladie neurodégénérative (Rat et al., 2011), suggérant qu'il pourrait contribuer au déclin cognitif chez ces personnes. D'ailleurs, l'administration de PACAP et le maintien de l'expression du PAC1 dans l'hippocampe contribuent à contrecarrer les déficits cognitifs trouvés dans le labyrinthe en T et dans le test de reconnaissance d'un objet nouveau chez un modèle de souris de la maladie d'Huntington (Cabezas-Llobet et al., 2018). L'ensemble de ces données suggère que l'utilisation du PACAP pourrait représenter un outil thérapeutique intéressant pour traiter les désordres neurologiques et les déficits comportementaux à long terme.

OBJECTIF

Les données de la littérature présentées dans cette introduction montrent qu'une exposition *in utero* à l'éthanol exerce des effets délétères en particulier sur le cerveau de l'embryon, dont les effets varient en fonction du stade de développement. Ceci conduit chez ces enfants SAF à diverses malformations et déficits fonctionnels qui constituent un problème majeur de santé publique. Néanmoins, la détection de ces enfants SAF avant la naissance reste très difficile, les mécanismes moléculaires qui conduisent aux altérations du cerveau ne sont que partiellement connus et aucune stratégie thérapeutique n'est encore disponible pour enrayer les effets délétères de l'alcool. On sait néanmoins que le métabolisme de l'éthanol génère la formation de ROS *in utero* responsable d'un stress oxydatif entraînant la mort apoptotique d'une partie des cellules. À l'inverse, le neuropeptide PACAP est connu pour combattre le stress oxydatif et inhiber l'apoptose, entre autres dans des modèles de toxicité de l'éthanol *in vitro* et *in vivo*. L'objectif général du projet était donc de déterminer l'implication du PACAP endogène dans la protection du cerveau dans un modèle de SAF murin et de rechercher les mécanismes moléculaires permettant de comprendre comment le PACAP protège le cerveau au cours du développement des effets délétères de l'éthanol

Pour cela, nous avons établi un modèle murin de SAF chez la souris par administration intrapéritonéale d'alcool à des mères gestantes et mis en place une méthode d'injection de PACAP par voie intra-utérine. Nous avons parallèlement aux injections mesuré la survie, le taux d'avortement et la prise de poids des mères gestantes entre E7 et E18. Nous avons ensuite à E18 réalisé des analyses morphométriques des embryons et prélevé les cerveaux des animaux. Ces cerveaux ont ensuite été utilisés pour des études histologiques, biochimiques et génomiques afin de mettre en évidence l'impact de l'éthanol et du PACAP sur les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins au niveau en particulier du cortex cérébral. Afin d'essayer d'expliquer les effets observés, nous avons mesuré l'impact des expositions à l'éthanol et/ou des injections de PACAP sur l'expression et/ou l'activité de facteurs trophiques, de marqueurs du stress oxydatif, d'acteurs de la réponse inflammatoire, d'éléments clés de la cascade apoptotique et du système PACAPergique. Nous avons aussi recherché l'effet de cette alcoolisation prénatale et des traitements au PACAP pendant le développement embryonnaire sur le comportement des animaux l'âge adulte et sur la capacité de cellules neuronales à supporter une nouvelle agression dans un cerveau mature. L'ensemble de ce travail visait à améliorer notre compréhension des effets protecteurs à court et long terme du PACAP sur le développement du cerveau de souris exposées à l'alcool.

MATERIELS ET METHODES

Les procédures étant déjà décrites dans le matériel et méthode des articles, seule la méthode d'injection intra-utérine (IU) et les procédures de marquage avec l'isolectine IB4 sont ici détaillées avec des informations supplémentaires pour faciliter leur reproduction.

Procédure de traitement des souris gestantes

Souris de lignée sauvage

Quatre groupes d'animaux (souris SWISS), ont été constitués, *i.e.* le groupe contrôle, le groupe éthanol (1,5 g/kg), le groupe PACAP (5 µg/10 µl), et le groupe éthanol + PACAP (co-traitement). À partir de E7 et jusqu'à E18, les animaux ont reçu une injection quotidienne de 100 µl d'une solution saline de chlorure de sodium (NaCl 0,9%) et/ou d'éthanol à la dose de 1,5 g/kg à partir d'une solution d'éthanol à 15% poids/volume diluée dans du NaCl à 0,9%. Cette injection a été réalisée en intra-péritonéal (IP) à l'aide d'une seringue de 1 ml. À partir de E9 et jusqu'à E18, une administration par voie IU d'une solution saline (10 µl) et/ou de PACAP (5 µg dilué dans 10 µl de NaCl à 0,9%) a été réalisée concomitamment à l'administration par voie IP de NaCl ou d'éthanol comme décrit dans la Figure 12. Le poids corporel des animaux a été mesuré quotidiennement pendant toute la durée du traitement.

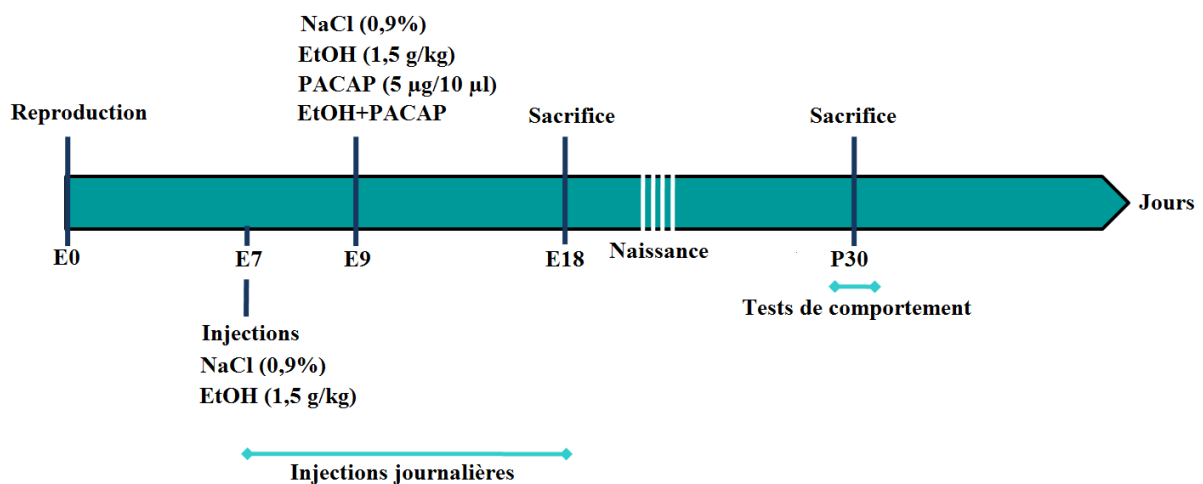


Figure 12 : Schéma récapitulant les différentes étapes du protocole d'injection chez les souris gestantes de E7 jusqu'au sacrifice des animaux à E18 ou P30.

Abréviations : EtOH : Ethanol ; NaCl : Chlorure de sodium.

Souris transgéniques

Pour étudier les conséquences d'une exposition à l'alcool sur le développement des souris invalidées pour le gène du PACAP (espèce CD-1 PACAP^{-/-}), trois groupes d'animaux ont été constitués, *i.e.* un groupe CD-1PACAP^{+/+}, un groupe CD-1PACAP^{+/-} et un groupe CD-1PACAP^{-/-}. Afin de minimiser la mortalité des souris gestantes transgéniques, la dose quotidienne d'éthanol administrée par voie IP entre E7 et E18 a été réduite à 1 g/kg. Le poids corporel des animaux a été mesuré quotidiennement pendant toute la durée du traitement.

Injection intra-utérine

L'injection IU de 10 µl d'une solution de PACAP (5 µg/10 µl/souris) est effectuée à main levée, dans le col de l'utérus de la souris avec une micro-seringue Hamilton de 10 µl (Hamilton SYR, 10 µl, 701N) reliée à une aiguille de 3,5 mm (diamètre intérieur de 0,5 mm). Pour cela, l'aiguille est insérée à travers la peau avec un angle de 45° à une distance de 1,5 cm au-dessus de l'orifice vaginale et enfoncée sur une profondeur de 4,5 à 5 mm (Figure 13). La reproductibilité de cette méthode d'injection IU et la bonne diffusion dans l'utérus des substances injectées ont été vérifiées *in utero* par administration d'une solution d'encre de Chine permanente de couleur jaune qui révèle comme illustré sur la Figure 14, une diffusion d'encre jaune chez toutes les souris au niveau du col de l'utérus, de la corne utérine et de la vascularisation foetale.

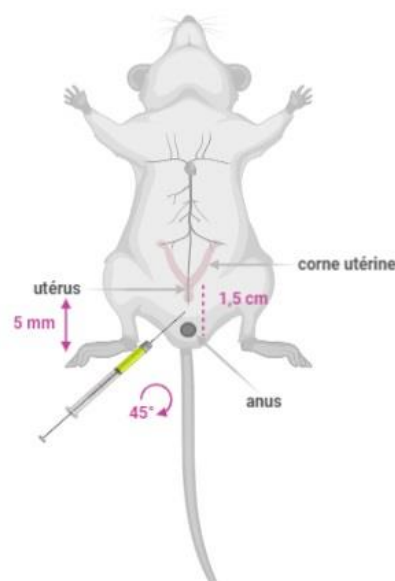


Figure 13 : Méthode d'injection intra-utérine chez la souris gestante.

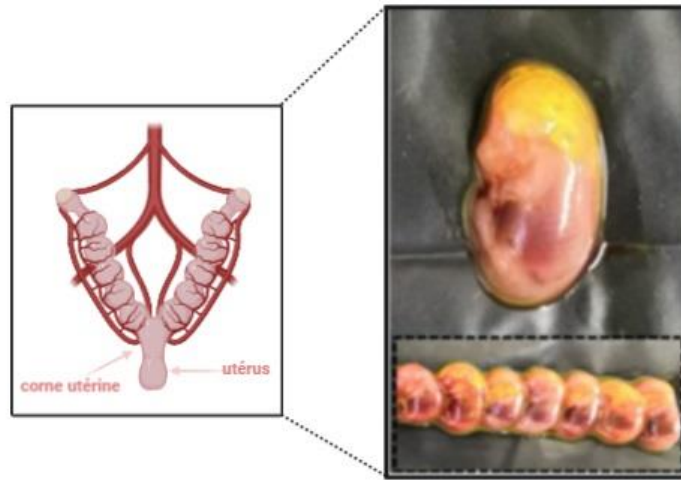


Figure 14 : Diffusion de l'encre de Chine jaune dans la vascularisation fœtale.

Prélèvement et préparation des tissus d'embryons

Les femelles gestantes ont été décapitées après anesthésie par inhalation d'isoflurane (Iso-Vet) puis ont subi une incision au niveau de la couche placentaire afin de récupérer les fœtus. Lorsque les embryons étaient destinés à réaliser des études immunohistochimiques, les femelles gestantes ont subi une perfusion intracardiaque d'une solution de NaCl à 9%, suivie d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% avant le prélèvement. Ensuite, ces fœtus ont été photographiés, disséqués sous une loupe binoculaire dans une solution de *phosphate buffered saline* (PBS) 1X et les cerveaux ont été pesés. Ces cerveaux ont ensuite été post-fixés dans 5 ml de PFA 4% pendant une nuit avant d'être conservés individuellement dans 5 ml de sodiumazide de 1% jusqu'à utilisation pour des analyses immunohistochimiques ou histologiques.

Pour les dosages biochimiques, les cerveaux d'embryons E18 ont été broyés sur glace dans un tampon de lyse composé de PBS, de NaCl 150 mM, de sodium dodecyl sulfate (SDS) 2 mM, de Tris 20 mM et d'inhibiteurs de protéases. Pour cela, le broyat a été soniqué puis centrifugé à 960 g pendant 10 min et le surnageant a été aliquoté avant congélation à -80°C pour servir ultérieurement aux dosages biochimiques. Pour les analyses transcriptomiques, les

cerveaux d'embryons E18 ont été rapidement plongés après la dissection dans 1 ml de TRIzol (TRI Reagent ; Sigma-Aldrich).

Marquage avec l'isoelectine IB4 sur tranches histologiques

Afin d'étudier l'effet du PACAP vis-à-vis d'une exposition *in utero* à l'éthanol sur la vascularisation cérébrale sur coupes de tissus, un marquage à l'isoelectine IB4 (From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor™ 594 Conjugate, ThermoFisher, I21413) a été réalisé sur des tranches de cerveau d'embryons au stade E18. Pour cela, des femelles gestantes ont reçu une injection IU de 10 µl d'isoelectine IB4. Une solution mère d'IB4 composée de 500 µg de sonde lyophilisée diluée dans 500 µl de tampon de CaCl₂ a été diluée au 50^{ème} avec du tampon 1.0 mM de CaCl₂ et injectée 10 minutes avant euthanasie. Les coupes de cerveau d'embryons fixés de 40 µm d'épaisseur ont été réalisées au vibratome (Leica Microsystems VT100S), puis placées dans une plaque 24 puits. Une perméabilisation du tissu a été réalisée pendant une heure en présence de normal donkey serum (NDS) dilué au 50^{ème} dans 10 ml de solution d'incubation contenant du PBS 1X et du Triton X-100 (0,3%) afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes ont ensuite été incubées une nuit (15 heures) à 4°C avec l'isoelectine IB4 (25 µl) diluée dans la même solution d'incubation que le NDS. Les coupes ont été rincées au PBS 1X, puis montées en Mowiol (Calbiochem) entre lame et lamelle. Après séchage des coupes pendant une nuit, la vascularisation cérébrale a été observée à l'aide d'un microscope CD7 (ZeissCellDiscoverer7) équipé d'une caméra (cMos Flash 4, Hamamatsu) fonctionnant avec le programme Zen (2.6 Blue Edition). Toutes les images ont été obtenues en excitant le fluorochrome Alexa 594 avec des leds éclairant à 567 nm (Cy3) et à 625 nm (Cy5) et en collectant la fluorescence avec un filtre multi-bandes (592 ± 15 nm et 709 ± 100 nm). L'acquisition des images a été faite avec un objectif 5X combiné avec une lentille 0,5X en mode Tiles avec une intensité des leds à 10% et un temps d'acquisition de 100 ms.

Marquage avec l'isoelectine IB4 de cerveaux transparents (clearing)

Afin d'étudier l'effet du PACAP vis-à-vis d'une exposition *in utero* à l'éthanol sur la vascularisation cérébrale sur cerveaux entiers, un protocole de transparence (clearing) des tissus marqués a été développé. Après prélèvement des embryons à E18 puis post-fixation des cerveaux dans du PFA 4% pendant une nuit (Figure 15A), les tissus ont été rincés avec du PBS 1X et incubés une nuit sous agitation lente (70 rpm) à 37°C en présence de 25 µl d'isoelectine IB4 diluée dans un tampon composé de PBS 1X, gélatine 0,2% et Triton X-100

0,5%. La transparenisation (clearing) des cerveaux d'embryon a été réalisée dans des tubes polypropylène résistant au dibenzyléther (DBE). Pour cela, les cerveaux ont été rincés avec du PBS 1X puis une déshydratation des tissus a été réalisée dans des bains successifs de méthanol contenant respectivement 20%, 40%, 60%, 80% puis 100% de méthanol dilué dans de l'eau (Figure 15B). Après stockage des cerveaux dans du méthanol 100% pendant une nuit, les tissus ont été incubés pendant 3 heures dans une solution de dichlorométhane (DCM) 66% (Sigma-Aldrich) et de méthanol 33%, sous agitation lente (15 rpm) à température ambiante (Figure 15C). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 15 minutes sous agitation lente dans deux solutions successives de DCM 100%. Une dernière incubation a été réalisée dans du DBE pendant toute la nuit (15 heures), sous agitation lente (Figure 15D). Les tubes contenant les embryons transparisés ont ensuite été complètement remplis de DBE pour éviter toute oxydation des échantillons et maintenus à l'abri de la lumière une semaine avant l'imagerie pour améliorer la transparence tissulaire et permettre un meilleur rapport signal sur bruit. Une fois l'échantillon placé dans un portoir réservoir (100% quartz, LaVisionBioTec, Bielefeld, Allemagne), la vascularisation cérébrale a été observée à l'aide d'un microscope à feuille de lumière (Ultramicroscope II, LaVisionBioTec) et d'une caméra PCOEdgeSCMOS CCD (2560×2160 pixels, LaVisionBioTec). Toutes les images ont été acquises en excitant le fluorochrome avec un laser à 594 nm et en collectant la fluorescence avec un filtre 561 nm ou un filtre 640 nm avec le programme InspectorPro software (LaVisionBioTec).

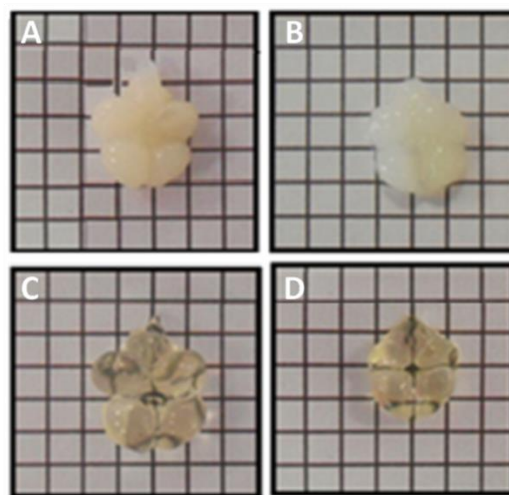


Figure 15 : Étapes de clearing de cerveau d'embryon au dix-huitième jour embryonnaire (E18).

(A) : E18 avant transparenisation ; (B) : E18+IB4 ; (C) : E18 sans lipides ; (D) : E18 après transparenisation.

La visualisation par reconstruction volumique et surfacique en 3D des images acquises avec le microscope feuille de lumière a été réalisée à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane version 9.5). Toutes les images ont d'abord été converties en format image Tiff (UltraII_C00_xyz-Table) pour réaliser la reconstruction 3D. La première quantification réalisée pour la caractérisation et la quantification des vaisseaux embryonnaires en 3D a été réalisée avec le module de *Filament Tracer* (Autopath) qui génère des surfaces (ROI) pour le calcul. A partir de cette extension, il a été possible de quantifier dans une surface donnée du cerveau embryonnaire, le volume, le diamètre et la longueur des vaisseaux qui s'y trouvent. Pour cela, une succession d'étapes a été nécessaire comme indiqué ci-dessous.

- Ouvrir les images converties avec Imaris (Bitplane, version 9.5)
- Utiliser la fonction filament (*autopath*) pour tracer la surface
- Identifier la zone d'intérêt surface (ROI) en 3D et fixer les repères de la zone déjà sélectionnée
- Identifier le point d'origine du traçage des filaments des vaisseaux et lancer le calcul
- Repérer la taille maximale et minimale des vaisseaux en passant dans le mode coupe (*Slice*)
- Revenir dans le mode 3D et ajuster les points de traçage du début (*Starting points Threshold*) et celui de la fin (*Seed points Threshold*)
- Identifier le type de paramètres à calculer (volume, diamètre, longueur) et le *Channel* selon le type de marquage
- Lancer l'analyse (scan) de l'image en modulant l'icône de traçage (*Shortest distance from distance Map*)
- À la fin de l'analyse de l'image qui prend environ 30 minutes par zone sélectionnée (ROI), les images des vaisseaux seront prêtes à télécharger
- Les différents types de paramètres de la vascularisation choisie seront représentés dans un tableau Excel à exporter.

Études comportementales

L'étude du comportement des souris âgées de 30 jours (P30) a été réalisée pour rechercher si la capacité du PACAP à bloquer les effets délétères de l'éthanol au niveau cellulaire et moléculaire est associée à une amélioration de l'activité locomotrice et à une diminution de l'anxiété. Les tests finaux ont été réalisés avant la mise à mort des animaux à P30. Le jour des tests, les souris P30, sont placées dans la salle une heure avant le début des tests. A la fin de chaque test, l'animal est remis dans sa cage d'élevage et le dispositif nettoyé par de l'éthanol à 70%. Un ordre chronologique des tests a été rigoureusement respecté pour chaque animal et déterminé de façon à avoir des conditions optimales de réponse.

Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM) :

Le dispositif est constitué de deux bras croisés situés 50 cm au-dessus du sol, formant respectivement deux bras ouverts (de 50 cm de long et 10 cm de large chacun) et deux bras fermés (de 50 cm de long, 10 cm de large chacun et 45 cm de côté) (Patin et al., 2005). Chaque souris est placée individuellement dans le centre du dispositif et son exploration libre est mesurée pendant 5 min. Ce test est utilisé pour évaluer l'état d'anxiété chez les rongeurs sachant qu'un animal anxieux tend à préférer naturellement les espaces clos par rapport aux espaces ouverts. Ainsi l'état d'anxiété des animaux est mesuré par le degré d'évitement des espaces ouverts du labyrinthe. Les paramètres mesurés dans ce test sont (le temps passé dans les bras ouverts et fermés, et le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés) (Figure 16).

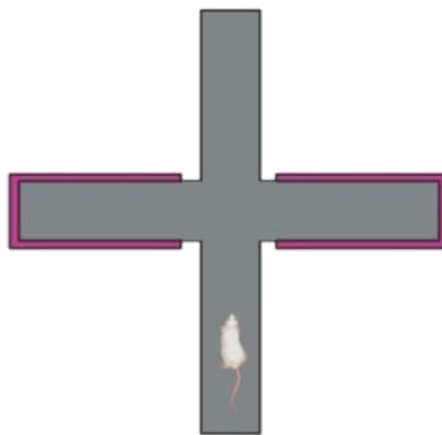


Figure 16 : Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze)

Test de la planche à trous (Hole-Board test, HBT)

La planche mesure 40 x 40 cm par 2,2 cm d'épaisseur et comporte 16 trous de 3 cm de diamètre. Elle est de couleur gris foncé pour éviter les reflets pouvant perturber le comportement de l'animal. Chaque souris âgée de P30 est placée individuellement dans le centre du dispositif et son exploration libre est mesurée pendant 5 min. Ce test permet d'étudier le comportement de la souris confrontée à un nouvel environnement. Les paramètres mesurés dans ce test sont le nombre de trous explorés et le temps passé à explorer le dispositif. On définit l'exploration par le fait de rentrer la tête jusqu'aux oreilles dans un trou (Figure 17).

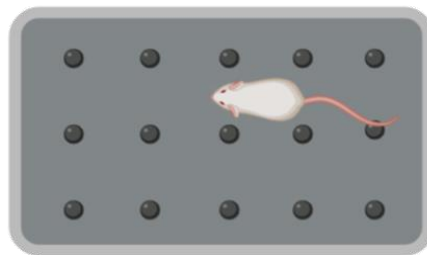


Figure 17 : Test de la planche à trous (Hole-Boardtest)

Test de boîte claire/obscur (Light/Dark Box, LDB) :

Ce test évalue le degré d'anxiété et l'activité exploratrice de l'animal. Les rongeurs ont une tendance de rester dans les endroits sombres, évitant ceux éclairés. Ce dispositif permet aux souris âgées de P30 d'explorer une arène formée de deux compartiments (d'une surface de 40 ×70cm), l'un éclairé par une lampe blanche (Led E27, 9W) et l'autre obscur, éclairé par une lampe rouge de faible intensité (2.5 W). Une ouverture séparant les deux compartiments permet à l'animal de se déplacer librement entre la zone éclairée et celle obscure. Au début du test, la souris P30 est placée dans le compartiment éclairé et ses activités comportementales, à savoir le temps passé dans l'espace éclairé et dans l'espace sombre, et les fréquences d'entrées dans les zones éclairées sont enregistrées pendant 5 min (Figure 18).

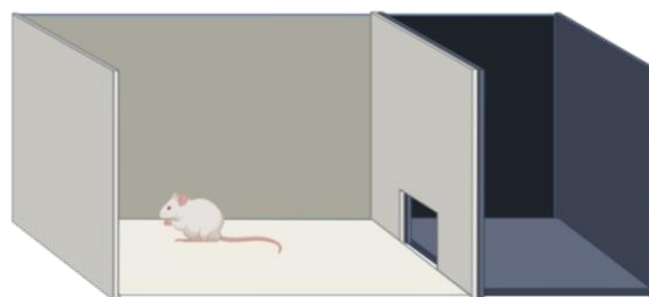


Figure 18 : Test de boîte claire/obscur (Light/Dark Box)

Analyses statistiques

Le logiciel Graphpad Prism (GraphPad Software, version 6.04) est utilisé pour l'ensemble des analyses statistiques. Pour les données non paramétriques concernant les tests EPM, HBT et LBD chez les souris exposées durant leur vie embryonnaire à l'alcool, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). Toutes les analyses sont suivies par un test post-hoc (Tukey-Karmer's), ANOVA répété à 2 facteurs (temps et fréquence). Les différences sont considérées statistiquement significative quand $p < 0.05$.

RESULTATS

Article 1**Effet protecteur du PACAP endogène et exogène chez des animaux exposés à l'éthanol pendant la vie embryonnaire**

Shili Ilhem, Masmoudi-Kouki Olfa, Vaudry David

(en préparation)

La consommation d'éthanol pendant la grossesse peut engendrer des dommages irréversibles à l'enfant regroupés sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF). Comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité de l'alcool, détecter les enfants SAF et leur proposer des solutions thérapeutiques est un problème de santé publique important. Il est établi que le neuropeptide PACAP exerce des effets neuroprotecteurs puissants. Ceci nous a conduit à étudier l'implication du PACAP endogène dans la protection du cerveau des souris exposées à l'alcool et à rechercher la capacité d'administrations de PACAP exogène à bloquer les effets toxiques de l'éthanol au cours du développement.

Notre travail a consisté à :

- * Etudier l'effet du PACAP endogène et exogène sur le développement d'embryons exposés de façon chronique à l'éthanol,
- * Rechercher l'effet du PACAP endogène et exogène sur différents mécanismes altérés par l'éthanol au cours du développement embryonnaire,
- * Evaluer l'expression du système PACAPergique chez les embryons exposés de façon chronique à l'éthanol.

Protective effects of endogenous and exogenous PACAP in mice exposed to ethanol during embryonic life

Shili Ilhem^{1,2}, Masmoudi-Kouki Olfa¹ and Vaudry David^{2,3}

¹*Laboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology & Biomolecules Valorisation, Research Unit LR18ES03, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia*

²*Inserm U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, University of Rouen, 76128 Mont-Saint-Aignan, France*

³*Regional Platform for Cell Imaging of Normandie (PRIMACEN), Institute for Biomedical Research and Innovation, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France*

Abstract

Ethanol prenatal exposure exerts teratogenic effects leading to morphological lesions due among others to a massive wave of apoptosis in the developing brain. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has been shown to exert neurotrophic and neuroprotective activities in various cellular models. The aim of the present study was to characterize the neuroprotective activity of endogenous and exogenous PACAP against the deleterious effects of *in utero* ethanol exposure on E18 embryos in a fetal alcohol syndrome (FAS) mice model. Results show that PACAP exerts trophic activity on mice embryos and partially blocked the ethanol induced atrophy. PACAP acts on both neurons, astrocytes and blood vessels, but the neurotrophic and neuroprotective actions of PACAP involve complementary mechanisms since PACAP per se had no effect on GDNF expression or caspase-3 activity for example but completely counteracted the GDNF collapse and the caspase-3 induction observed in ethanol treated animals. Conversely, the PACAP induced increase of BDNF or IGF mRNA is very similar, whether the animals are exposed or not to ethanol. It was also found that in PACAP KO animals exposed to ethanol, expression level of neurotrophic factors is strongly repressed, ROS abundance is highly enhanced and caspase-3 activity is heavily increased, showing the protective effect of endogenous PACAP against ethanol toxicity. However, ethanol greatly affects the PACAPergic system by decreasing the expression of PACAP, VIP and their 3 receptors, which may be a new mechanism involved in ethanol toxicity. Interestingly, the expression of all transcripts of the PACAPergic system, excepted the one of VPAC1, could be restored in ethanol exposed animals by intra-uterine injections of PACAP, which probably potentiates the antioxidant and antiapoptotic activity of

PACAP, and explains the paradoxical effects of the peptide on the inflammatory response. Altogether, these results demonstrate the strong involvement of PACAP in the cortical morphogenesis, vascular organization or redox status of the brain of prenatal ethanol exposed animals and suggest that PACAP could be of a biomarker or a therapeutical agent for the treatment of SAF.

Introduction

In utero alcohol exposure can cause growth retardations, cranio-facial dysmorphias and anatomical alterations of the developing central nervous system (CNS) (Ferraguti et al., 2020; Jones and Smith, 1973; Sowell et al., 2001), resulting in cognitive, motor and behavioral disabilities (Green et al., 2007; Lebel et al., 2011; Lewis et al., 2015). Those birth defects found in children of mothers who consumed alcohol during pregnancy have been reported as fetal alcohol syndrome (FAS). The prevalence of FAS is estimated to be 14.6 per 10 000 in North America (Popova et al., 2017) and remains the leading known preventable cause of mental retardation (Green et al., 2007; Lebel et al., 2011; Lewis et al., 2015).

The risk of brain damages after *in utero* ethanol exposure is particularly high during the first and second trimesters, which correspond to intense periods of fetal neurogenesis and angiogenesis (Raghunathan et al., 2018). As a consequence, such gestational alcohol exposure leads to a reduced head circumference due among others to a decreased frontal cortex size and a disrupted cerebellar growth (Handmaker et al., 2006; Wass et al., 2001). The mechanisms by which ethanol induces brain atrophy are numerous and complex. In particular, during early development, ethanol inhibits the expression of neurogenesis-related genes, represses the release of mitogenic factors and induces methylation of cell cycle genes, which decreases the cell proliferation rate (Hicks et al., 2010; Jacobs and Miller, 2001; Tyler and Allan, 2014). At later stages, ethanol disturbs neuronal migration and differentiation (Maier and West, 2001).

In particular, ethanol hampers the migration of neuroblasts from the ventricular zone (VZ) towards the cortical plate (CP) in the cerebral cortex (Cuzon et al., 2008; Miller, 1988) and from the external granule cell layer towards the internal granule cell layer in the cerebellum (Kumada et al., 2006). The inhibition of cerebellar granule cell migration involves an activation of the adenylate cyclase, responsible for a decrease in the frequency of calcium spikes (Kumada et al., 2006). But neuronal precursor migration is probably also altered by the accelerated transformation of radial glia into astrocytes (Miller and Robertson, 1993) and by the reduction of cortical vascular density (Jégou et al., 2012), induced by ethanol. This highlights that it is not only the effect of ethanol on neurogenesis but also its action on astroglialogenesis (Gressens et al., 1992) and angiogenesis (Radek et al., 2005, 2008), which altogether lead to brain alterations. Toward the end of the development, ethanol exposure reduces the expression of neurotransmitters and growth factors involved in neuronal differentiation (Ogony et al., 2013). In addition to all this, ethanol impairs neuronal survival

(Xu et al., 2003; Climent et al., 2002; Olney et al., 2000), either directly, or through the generation of acetaldehyde, one its major toxic metabolites (Lee et al., 2005). Indeed, ethanol exposure, even for short duration or at low levels generates oxidative stress in fetal brain (Dong et al., 2010; Henderson et al., 1995; Maier et al., 1999a, 1999b) through the production of reactive oxygen species (ROS) and a concomitant decrease in the level of antioxidant defenses. And the fetal brain is particularly vulnerable to the production of ROS, since it has a limited amount of antioxidant capacity (Floyd and Carney, 1992; Halliwell, 2006). The generation of ROS in fetal brain provokes neuronal cytoskeletal disruption (Chu et al., 2007), mitochondrial dysfunction (Ramachandran et al., 2001), lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA damages (Chu et al., 2007), leading altogether to neuronal cell loss (Gil-Mohapel et al., 2010; Todd et al., 2018). Besides direct oxidative stress in neurons, ethanol exposure activates microglia, reinforcing ROS production and triggering inflammatory cytokine expression (Guizzetti et al., 2014). This excessive activation of microglia in the developing brain (Komada et al., 2017; Terasaki and Schwarz, 2016), contributes to the neurodegeneration observed in children with FAS by increasing the expression of pro-apoptotic factors (Komada et al., 2017; Terasaki and Schwarz, 2016).

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) belongs to the glucagon/secretin/vasoactive intestinal peptide (VIP) family of peptides and is expressed endogenously in two forms of either 38- or 27-amino acids (Miyata et al., 1989). PACAP acts on three G protein coupled receptors, *i.e.* a specific PAC1 receptor which only binds PACAP and two VPAC1 and VPAC2 receptors with same affinity for both PACAP and VIP (Somogyvári-Vigh and Reglodi, 2004). PACAP and its receptors are expressed both in the brain and the periphery (Vaudry et al., 2009). Thereby, PACAP is a pleiotropic peptide which exhibits among other things a strong neuroprotective effect both *in vitro* (Abad and Waschek, 2011; Reglodi et al., 2011; Shintani et al., 2005; Vaudry et al., 2002a) and *in vivo* (Reglodi et al., 2012; Seaborn et al., 2011; Vaudry et al., 2009), through a combination of antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic effects (Vaudry et al., 2009). PACAP acts at adulthood but also exerts trophic effects on neurons and glial cells during development (Douiri et al., 2016; Reglodi et al., 2016). In particular, PACAP modulates cell proliferation (Suh et al., 2001; Waschek et al., 1998), enhances stem cell differentiation (Cazillis et al., 2004) and promotes neuronal survival through inhibition of apoptosis (Hoshino et al., 1993; Ohno et al., 2005).

PACAP protects developing neurons and astrocytes from oxidative stress caused by various toxic insults such as 4-hydroxynonenal (Ito et al., 1999), ceramides (Falluel-Morel et al., 2004; Vaudry et al., 2003a), hydrogen peroxide (Vaudry et al., 2002a) and ethanol (Bhave and Hoffman, 2002; Vaudry et al., 2002b). Furthermore, PACAP can redirect the microglial inflammatory response from a deleterious to a neuroprotective phenotype (Brifault et al., 2015). Altogether, these various effects of PACAP suggest that it could protect the developing brain from ethanol toxicity.

Many studies investigated the neuroprotective effects of an exogenous administration of synthetic PACAP but the use of PACAP antagonists, PACAP or PAC1-knock out mice has evidenced that the endogenous peptide is also involved in brain development (Allais et al., 2007; Falluel-Morel et al., 2008; Shintani et al., 2005) and protects neurons from various insults (Reglodi et al., 2012), including ethanol exposure (Vaudry et al., 2005). However, in a model of binge drinking, gene expression analysis revealed that PACAP protects from ethanol toxicity through different mechanisms in between adults and adolescent animals (Lacaille et al., 2015). Furthermore, PACAP expression level is very different from one brain region to the other (Palkovits et al., 1995) and exhibits various patterns of regulation in case of injury.

For example, PACAP expression elicits a biphasic variation after stroke with an initial rapid increase followed by a drop below control level (Stumm et al., 2007) and a spatiotemporal regulation after traumatic brain injury with a long-lasting decrease in the number of PACAP positive cells in the traumatized tissue but an increase in the pericontusional cortex. These up- and down-regulations of PACAP after nerve injury highlight that the role of PACAP in the protection of the brain remains complex. Furthermore, we are probably not all protected by PACAP with the same efficacy if we consider that PACAP blood level can significantly vary from one individual to the other (Ross et al., 2020), and the existence of nucleotide polymorphisms which modify the expression of the PAC1 receptor (Mercer et al., 2016). And to make things more complex, one polymorphism in the PAC1 receptor is implicated in the development of problematic alcohol use in women (Dragan et al., 2017). Based on those observations, the aim of this study was to analyze in a chronic model of prenatal ethanol exposure the neuroprotective effects of exogenous and endogenous PACAP and investigate some of the molecular mechanisms involved.

Material and methods

Animals

Swiss mice were kept in a temperature- and humidity-controlled environment ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity), under an established photoperiod (14:10 h light/dark cycle) with free access to food and water in an accredited animal facility (approved B.76-451-04). All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines for the care and use of experimental animals approved by the European Community Council Directive 2010/63/UE and authorization number 11863-2016111516454101.

Female and males were mated overnight, and embryonic day 0 (E0) corresponds to the moment when males were placed with females. To confirm pregnancy, weight gain was measured daily (Heyne et al., 2015).

CD1 PACAP wild-type (CD/PACAP^{+/+}), heterozygous (CD/PACAP^{+/-}) and PACAP knock-out (CD/PACAP^{-/-}) mice were obtained from the intercross of heterozygous animals. Genotypes of all mice were determined by PCR analysis of DNA isolated from tail biopsies (Hashimoto et al., 2001). At E18, pregnant mice were sacrificed, and the embryos were collected for further experiments.

Animal treatments and experimental design

Pregnant Swiss mice were divided randomly into 4 groups treated from E7 to E18, *i.e.* a control group treated with saline solution (0.9% NaCl; group 1) and three experimental groups treated respectively with ethanol (1.5 g / kg, group 2) by intraperitoneal injection, PACAP by intra-uterine injection (5 µg; group 3) or ethanol plus PACAP (group 4). Ethanol and PACAP were dissolved in saline solution. Control animals received an equivalent volume of 100 µl saline solution or of ethanol IP and of 10 µl of saline or PACAP IU. Ethanol was diluted in 0.9% saline to avoid burning and injected as a 15% (w/v) solution. PACAP was dissolved in 0.9% saline solution.

E18 embryo genotype was determined by multiplex PCR amplification of DNA extracted from tail biopsies as previously described (Tanaka et al., 2001). PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light. CD1 PACAP wild-type (CD/PACAP^{+/+}) and heterozygous (CD/PACAP^{+/-}) were identified by the presence of a single 293 bp PACAP cassette amplicon. The presence of PACAP knock-out

(CD/PACAP^{-/-}) mice was identified by the presence of a single 491 bp neomycin cassette amplicon.

Embryos morphogenesis measurements

At E18, pregnant mice were sacrificed and embryos were removed and placed in 1X PBS. Embryos were weighed and imaged with a macroscope (Leica Z6 APO) to measure with ImageJ software fetus length, skull size and brain surface.

Clearing procedure

At E18, pregnant mice were deeply anesthetized by isoflurane inhalation (1000 mg/g, Iso-Vet). Fetal brains were carefully removed under a binocular loop before being incubated in 4% PFA diluted in PBS at 4°C overnight. Brain tissues were incubated with IB4 diluted in PBSG-T buffer containing PBS, 0.2% gelatin, 0.5% Triton-X100 at 37°C under agitation (70 rpm). After PBS washed, brain tissues were cleared according to the iDISCO⁺ protocol.

Briefly, tissues were dehydrated in 6 successive solutions of methanol/H₂O for 1 hour under slow orbital shaking, containing 20%, 40%, 60%, 80%, 100% and 100% of methanol respectively. Next, tissues were incubated overnight in 1 vol of 100% methanol and 2 volumes of 100% dichloromethane anhydrous (Sigma-Aldrich) before being washed twice for 20 min in 100% dichloromethane under slow orbital shaking. Finally, the tissues were incubated in 100% dibenzyl ether (Sigma-Aldrich) for at least 1 day under slow orbital shaking before imaging.

Cleared brain tissues were placed in a horizontal orientation in an imaging reservoir made of quartz (LaVisionBioTec) filled with dibenzyl ether and illuminated from the side by a laser at a wavelength of 640 nm (Coherent Sapphire Laser, LaVisionBioTec, and Bielefeld Germany) under an Ultramicroscope II (LaVisionBioTec, Bielefeld, Germany) equipped of a binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus, Bielefeld Germany) with a 2X objective (MVPLAPO, Olympus, Bielefeld Germany) and controlled by the InspectorPro software (LaVisionBioTec, Bielefeld Germany). Fluorescence signal was selected with a 561±40 nm filter and images were acquired with a PCO Edge SCMOS CCD Camera (2560 × 2160 Pixel size, LaVisionBioTec).

Three-dimensional reconstruction was performed from a Z-series stack of fluorescence images taken at a 4 µm interval using the Imaris software (version 9.5). From each of this

stack of images, two adjacent regions of interest (ROI) measuring $500 \times 500 \times 500 \mu\text{m}$ were chosen at the dorsolateral pole of the cortex. In these ROIs, blood vessel diameter, total vascular length and total vascular volume were measured after network modeling using the filament tracer tool of the Imaris software 3D rendering package. The different measurements are based on observations made from brains of 4 to 5 animals for each condition and quantification is presented as mean \pm s.e.m ($n = 4$ to 5).

Histology and immunohistochemistry

Brains isolated from E18 embryos were immerse-fixed in 4% PFA overnight at 4°C . Then brains were washed twice in PBS for 5 min and embedded in 2% agarose (BioReagent, Sigma-Aldrich) to be sectioned into $40 \mu\text{m}$ thick slices on a vibratome (Leica VT1000S) along the coronal plane and transferred into PBS-AZIDE buffer.

For histological analysis, slices were stained with cresyl violet to visualize the layer thickness in the forebrain of the cortical plate (CP), intermediate zone (IZ), subventricular and ventricular zone (SVZ/VZ) layer thicknesses, imaged with a microscope (TS2 Nikon) and analyzed with the ImageJ software.

For immunostaining experiments, slices were incubated overnight at 4°C with either rabbit glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (Dako; 1 : 600) or mouse neuronal specific marker (NeuN) monoclonal antibody (Milipore; 1 : 100) diluted in incubation buffer (PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 3% Triton X-100). Then, slices were rinsed twice with PBS for 20 min and incubated with the same incubation buffer containing the appropriate secondary antibody, i.e. a donkey Alexa Fluor conjugated 488 anti-rabbit antibody (Invitrogen; 1: 200) to detect GFAP or a donkey Alexa Fluor conjugated 488 anti-mouse antibody (Invitrogen; 1: 200) to detect NeuN. Cell nuclei were visualized by incubating the slices for 5 min with 4, 6, diamidino-2-phenylindole (DAPI, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma). Finally, slices were mounted with Mowiol and coverslipped. Image acquisition was performed with a confocal microscope (TCS SP8 MP, Leica Microsystems) using the sequential analysis mode.

Isolectin IB4 vascular labelling

The brain vasculature was labeled with Isolectin IB4 (From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor™ 594 Conjugate, Thermo Fisher). Mice received an intrauterine injection of 10 µl IB4 (From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor™ 594 Conjugate, Thermo Fisher). Fetal brains were carefully removed under a binocular loop to be sectioned after fixation into 40 µm thick slices on a vibratome (Leica VT1000S) along the coronal plane. E18 sections were incubated overnight at 4°C with IB4 diluted 1:50 (25 µg /ml) in PBS 1X, 1% BSA and 3% Triton X-100 buffer. Slices were then rinsed twice with PBS for 20 min and mounted with Mowiol and coverslipped. Image acquisition was performed with CD7 microscope (Zeiss cell discoverer 7), using Zen program (2.6 Blue Edition).

Measurement of biomacromolecule oxidative damage

Fetal brain tissues were homogenized in lysis buffer composed of 150 mM NaCl, 2% SDS, 20 mM Tris and 10 mM EDTA protease free inhibitor tablets (Thermo Scientific, Paris, France) at pH 7.6 and sonicated for 10 s. The lysate was subsequently centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4°C and supernatants were collected. Protein concentration from each fetal brain protein supernatants was measured with a Bradford assay (Bradford, 1976) and supernatants were stored at -80°C until quantification of oxidative stress markers. For protein quantification, 1 µL of fetal brain protein supernatant were incubated with 19 µl distilled water, and 980 µl of Bradford Buffer. The absorbance was measured at 595 nm with a Bio-Rad spectrophotometer.

Intracellular ROS production was measured by quantification of the fluorescence of 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich). For these experiments, 100 µl of fetal brain protein supernatants were incubated with 2 µl of DCFDA. In the presence of ROS, DCFDA is converted into 2', 7'- dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence intensity was then measured every 15 minutes for 45 minutes using a microplate reader (Tecan) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Data were standardized according to protein quantification of each sample.

Intracellular superoxide anion production ($O_2^{\cdot-}$ levels) was measured by quantification of the fluorescence of ethidium which derived from the oxidation of the non-fluorescent compound dihydroethidium (DHE). For these experiments, 20 µl of fetal brain protein supernatants were incubated for 20 min in the dark with 2 µM DHE in 24-well plates. Fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 528 nm using a fluorescence microplate reader FL800TBI (Bio Tek Instrument).

Intracellular superoxide anion production (H_2O_2 levels) was measured by quantification of the fluorescence of rhodamine-123 (R-123). For these experiments, 20 μl of fetal brain protein supernatants were incubated for 20 min with 2 μM of the non-fluorescent DHR-123 in 24-well plates, which upon reaction with hydroxyl radical releases fluorescent rhodamine-123 which was measured with a microplate reader FL800TBI (Bio Tek Instrument) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) was evaluated by a colorimetric detection kit (Arbor Assays, 9132). For these experiments, 2 μl of fetal brain protein supernatants were incubated with 25 μL Colorimetric H_2O_2 Detection substrate, and 25 μL HRP Preparation (Horseradish Peroxidase diluted in 1:50 of Assay Buffer) in 24-well plates. After 15 minutes of incubation, the absorbance was measured at 560 nm with a Bio-Rad spectrophotometer. All reactions were calibrated with a standard curve ranging from 25 μM to 1000 μM .

Nitric oxide (NO) production was analyzed in fetal brain homogenates using DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate; Molecular Probes/Invitrogen). For these experiments, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of DAF-FM was incubated at a 10 μM final concentration with 100 μL of fetal brain protein supernatants in 24-well plates. After 15 minutes of incubation in the dark, the fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm using a microplate reader (Tecan).

Measurement of oxidative stress markers

Fetal brain tissues were homogenized in lysis buffer composed of 150 mM NaCl, 2% SDS, 20 mM Tris and 10 mM EDTA protease free inhibitor tablets (Thermo Scientific, Paris, France) at pH 7.6 and sonicated for 10 s. The lysate was subsequently centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min at 4°C and supernatants were collected. Protein concentration from each supernatant was measured and supernatants were stored at -80°C until quantification of oxidative stress markers.

SOD activity was measured using a spectrophotometric assay, which consists in measuring epinephrine auto-oxidation induced by superoxide anion. For these experiments 25 μl of fetal brain protein supernatants were incubated for 3 min with a mixture containing bovine catalase (0.4 U/mL), DL-epinephrine (5 mg/ml) and $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ buffer (62.5 mM, pH 10.2). The oxidation of epinephrine was measured at 480 nm with a Bio-Rad spectrophotometer (Hamdi et al., 2016).

Catalase activity was quantified using a spectrophotometric assay, on the basis of the decomposition of H_2O_2 in the reactive mixture (Ghouili et al., 2018). For these experiments 25 μl of fetal brain protein supernatants were mixed with 30 mM H_2O_2 in PBS. The disappearance of H_2O_2 was measured with an ultraviolet light spectrophotometer at 240 nm for 180 s at 30 s intervals. Catalase activity was calculated using the extinction coefficient of $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for H_2O_2 .

Malondialdehyde (MDA, *i.e.* a lipid oxidation product) content was determined according to the heating method of Drapper and Hadley (Draper & Hadley, 1990). For these experiments, 20 μl of fetal brain protein supernatants were mixed with a solution containing 1% BHT (w/v) and 20% TCA (w/v), and then centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min at 4°C . Supernatant was mixed (v/v) with a solution containing 0.5 M HCl, 120 mM TBA and 26 mM Tris. The mixture was immediately heated for 10 min at 95°C and then cooled à 4°C . The absorbance was measured at 532 nm with a Bio-Rad spectrophotometer. MDA levels were determined by using an extinction coefficient of MDA-TBA complex of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Oxidative damages of proteins were evaluated by measuring protein carbonylation levels. For these experiments, 25 μl of fetal brain protein contained in supernatants were precipitated by addition of 20% TCA (v/v) and 10 mM DNPH (w/v). After centrifugation at $11,000 \times g$ for 3 min at 4°C , the homogenate was washed three times with an ethanol-ethylacetate solution (v/v) and then resuspended in 500 μl of 6 M guanidine hydrochloride. The absorbance was measured at 370 nm with a Bio-Rad spectrophotometer and protein carbonylation levels were determined by using an extinction coefficient of $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Glutathione quantification was performed using a mono-chlorobimane (MCB) which reacts with the GSH under the action of the glutathione S-transferase to become fluorescent (Kamencic et al., 2000). MCB, was prepared at 4 mM in 100% ethanol and stored in the dark at 4°C . For these experiments, 20 μl of fetal brain protein supernatants were incubated with 125 μl of HEPES-buffered saline (HBS) containing 51.3 mM NaCl, 1.7 mM KCl, 4.1 mM CaCl_2 , 1.5 mM MgCl_2 and 10 Mm HEPES at PH 7.9. Homogenized samples were transferred into 24-well microplates in the presence of MCB at a final concentration of 100 μM . The fluorescence intensity was measured over 60 minutes after addition of MCB, using a microplate reader (Tecan) at an excitation wavelength of 380 nm and 530 nm an emission.

Measurement of caspase-3 activity

The enzymatic activity of caspase-3 in the fetal brain was evaluated with the Apo-ONE homogenous caspase-3/7 Assay (Promega). For these experiments, 100 μ L of homogenized fetal brain tissue were combined with 100 μ l of caspase assay buffer and fluorescence intensity was then measured over 3 hours using a microplate reader (Tecan) thermostatically controlled at 37°C at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Data were standardized after protein quantification of each sample with a Bradford assay.

Quantification of brain gene expression by Real-time PCR analysis

On E18, pregnant mice were deeply anesthetized by isoflurane inhalation prior decapitation. Embryos were rapidly dissected from the uterine horns and placed in ice-cold PBS. Maintained on a cold platform, embryonic brains were rapidly removed from skulls, and transferred into Tri-Reagent (Sigma Aldrich).

To detect possible changes in gene expression, total RNA from brain hemispheres of E18 control, ethanol and PACAP treated animals were extracted with the phenol/chlorophorm method and further purified using the Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The amount of isolated RNA was determined with a Nanodrop ND-2000C (Thermo Scientific, Wilmington, CA, USA) and cDNA was synthesized from 1 μ g of RNA using the ImProm II Reverse Transcriptase kit (Promega, Madison, WI, USA). Genes expression level was then measured with a QuantStudio 12K Flex (Life Technologies), in the presence of 2X Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies) containing specific primers at a concentration of 100 nM as reported by alphabetical order on Table 2. Regulations between control and treated groups were finally determined with the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method.

Results

PACAP reduces birth defects induced by prenatal binge-like drinking ethanol exposure

Daily intraperitoneal injection of 1.5 g/kg of ethanol to pregnant mice between E7 and E18, induced a progressive mortality, reaching 30% of females at gestational day 18 while mortality in females injected with both ethanol and PACAP was of 10% only (sup Fig 1A). No mortality was observed in animals injected with PACAP and/or NaCl. In addition to this effect on mortality, ethanol caused abortion in 11% of surviving pregnant females (sup Fig 1B) whereas no or a very little abortions were observed in sham, PACAP or co-treated animals. Furthermore, pregnant females exposed to ethanol exhibited a 10% reduction in body weight at gestational day 18 compared to sham animals. This deleterious effect of ethanol was totally blocked by an intra-uterine PACAP administration. Regarding offspring, *in utero* PACAP injections increased the size of the fetuses while alcohol exposure resulted in growth restriction which was partially blocked when ethanol exposed animals received also PACAP intrauterine injections (Fig.1A). These observations were confirmed by quantification of fetuses body weight (Fig. 1B), body length (Fig. 1C) and skull length (Fig. 1D), which were increased to 125% in PACAP treated fetuses and 62% decreased to 61% in ethanol exposed fetuses, when compared to sham animals. This deleterious effect of ethanol was partially blocked by an intra-uterine PACAP administration (87% of control). When looking at the brain, PACAP intrauterine injections induced a 24% and 34% increase of brain area and weight, respectively, while alcohol exposure resulted in microcephaly (Fig. 1E) with a 25% decrease of brain area (Fig. 1F) and a 35% decrease of brain weight (Fig. 1G). These deleterious effects of ethanol were partially blocked by an intra-uterine PACAP administration (6% and 12%).

Prenatal injection of PACAP caused an apparent 90% increase of the thickness of the E18 fetuses cerebral cortex when compared to sham animals (Fig 2 A) mainly due to an increase in the SVZ/VZ and IZ layers (Fig 2 A1, A2, A3, A4, A5). Conversely, ethanol exposure caused a 45 ± 5 % reduction of the thickness of the E18 fetuses cerebral cortex when compared to sham animals (Fig 2 A; *** $P < 0.001$) which was partially blocked when animals were co-treated with ethanol plus PACAP (+45% of ethanol treated animals).

Consistent with previous reports, ethanol exposure resulted in glial activation (Saito et al., 2016) in E18 fetuses brains as shown by immunohistolabeling with GFAP (Fig 2D). Glial activation could be observed in the forebrain SVZ/VZ (Fig 2 D3) but a very strong GFAP

signal was detected in the striatum zone (Fig 2 E3) when compared to sham embryo (Fig 2 E1). PACAP injection had no effect on its own (Fig 2 D2 and E2) but blocked ethanol activation of GFAP in both SVZ/VZ (Fig 2 D4) and striatum (Fig 2 E4).

Besides astrocytes, neuron precursors labelled with NeuN appeared more numerous after PACAP injection in the SVZ/VZ, compared to sham animals (Fig. 2 C1-C2). Conversely, ethanol exposure reduced the number of migrating neuron precursors in the IZ and dislocated the organization of the neurons forming after migration the SVZ/VZ (Fig 2 C3). This deleterious effect of ethanol was partially reduced in fetuses exposed to both ethanol and PACAP (Fig 2 C4).

PACAP up-regulates the expression of some growth factors in the CNS of fetuses in a model of prenatal binge-like drinking ethanol exposure

To understand what could affect the development of the cerebral cortex, the mRNA expression of 7 growth factors was measured in the brain of E18 fetuses, to identify some mediators potentially responsible for the trophic effects of PACAP injections and/or explain the deleterious action of ethanol exposure. Results show that ethanol reduced more than 10-fold GDNF, 0.5-fold BDNF, 0.49-fold VEGFa, 0.1-fold TGF and 0.85-fold IGF but did not affect FGF and VEGFb (Fig 3). Co-treatment with ethanol plus PACAP restored above sham level the expression of GDNF (+ 15%), FGF (+690%), VEGFa (+43%), VEGFb (+23%) and TGF (+134%) but had no effect on BDNF and IGF. PACAP alone had no significant effect on GDNF and TGF mRNA expression but induced a 4-fold increase of FGF, a 2-fold increase of BDNF, a 1.6-fold increase of VEGFa, a 1.4-fold increase of VEGFb, and a 1.6-fold increase of IGF. When looking at growth factors mRNA expression in PACAP deficient mice, it appeared that both GDNF, FGF and BDNF mRNA expression was strongly repressed, by 84%, 90% and 87% respectively, in PACAP knock out animals exposed to ethanol, compared to wild type animals exposed to same ethanol treatment. Interestingly, GDNF mRNA was similar in both wild type and PACAP heterozygote E18 fetuses brains while BDNF expression in both PACAP heterozygote and PACAP knock-out E18 fetuses brains (Fig 3 B1-B2-B3).

Effect of PACAP on brain vasculature network in fetus exposed in utero to ethanol

Considering that some factors regulated by ethanol and PACAP could affect angiogenesis, cerebral cortex microvessels from E18 fetuses were visualized using Isolectin GS-IB₄ from Griffonia simplicifolia coupled to Alexa Fluor™ 594 (Fig 4A).

Observation of the images shows that PACAP treated animals exhibit a thicker cortical layer with a denser network of microvessels compared to sham animals (Fig 4B1) whereas ethanol treated animals present a very thin cortical layer of widely spaced vessels (Fig 4B3). In ethanol plus PACAP co-treated animals, the thickness of cerebral cortex vessels was partially restored (Fig 4B4).

In accordance with these observations, quantification revealed that in Sham treated animals, the cortical vessel layer thickness was of 264 μm , while it was of \approx 359 μm in PACAP treated animals, of 110 μm in ethanol exposed fetuses and of 200 μm in the brain of ethanol plus PACAP co-treated animals (Fig 4C). In the same way, the diameter of cortical vessels was of 5.53 μm in Sham treated fetuses, while it was of \approx 7.52 μm in PACAP treated animals, of 4.85 μm in ethanol exposed animals and of 6 μm in the brain of ethanol plus PACAP co-treated animals (Fig 4D), indicating that ethanol reduced the vessel lumen diameter.

Results show that prenatal exposure to ethanol affects the whole microvessels network (Fig 4B). To further evaluate this observation, we performed a detailed analysis of cortical vasculature in the E18 fetal brain. Three parameters were quantified: vascular cortical thickness, vessel diameter and angular orientation of cortical microvessels. IB₄ labeling indicated that fetus E18 exposed *in utero* to ethanol group (1.5 g/kg) were mostly affected by vascular damage in the cortical thickness by 110 to 200 μm increased in PACAP (5 μg) treated fetuses and 280 to 110 μm decreased in ethanol exposure fetuses when compared to sham animals (Fig 4C). The diameter of vessels was also reduced by 6 ± 1 to 4 ± 1 μm increased in PACAP (5 μg) treated fetuses and 5 ± 1 to 4 ± 1 decreased in ethanol exposure fetuses when compared to sham animals (Fig 4D). Also, ethanol *in utero* significantly increased the proportion of microvessels presenting an angular value ranging between [50-75] and [75-90] from the radial axis (Fig 4E). Altogether, these data demonstrate for the first time that PACAP improves cortical vasculature in the fetal brain of animals exposed *in utero* to ethanol.

PACAP protects from oxidative damages induced by prenatal binge-like drinking ethanol exposure

To investigate the mechanisms involved in these effects of neurons and glia, the ability of PACAP to abolish ethanol-induced oxidative stress and ROS accumulation in the brain of E18 fetuses was investigated. As measured with 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). The ethanol induced 3-fold increase of ROS (Fig 5A, *** $p < 0.001$) and was significantly reduced in animals co-treated with ethanol and PACAP (Fig 5A, 150% of control, ### $P < 0.001$). Peroxides, measured with DHE probe, were significantly increased (Fig 5B, +254%) in the brain of ethanol (1.5 g/kg) exposed fetuses. This ethanol-increased of DHE fluorescence intensity was partially reduced in the brain of animals exposed to both ethanol and PACAP (Fig 5B, - 130%). Regarding NO, ethanol exposure induced a 4-fold increase of intracellular NO level (Fig 5C1, +300%) and a 7-fold increase of iNOS mRNA expression level (Fig 5C2, 700%), which were significantly reduced in the brain of E18 fetuses co-treated with ethanol and PACAP (### $P < 0.0001$). The expression of Sod1 and Sod2 mRNA level (Fig 5D1, D2) as wells as the activity of SOD (Fig 5D3) were increased in the brain of E18 fetuses exposed to ethanol but injection of PACAP to ethanol exposed animals only reduced expression of Sod2 mRNA level (Fig 5D2). Regarding peroxides, ethanol exposure induced a 2-fold increase of the production of intracellular and extracellular H₂O₂ levels (Fig 5E), which was totally abolished in the brain of fetuses co-treated with ethanol plus PACAP (Fig 5E, ±40%, ### $P < 0.0001$). Meanwhile, similar regulations were observed with antioxidants catalase, Gpx and GSH. Indeed, the increases induced by ethanol of catalase mRNA (+136%; Fig 5F1, ### $p < 0.0001$) and activity (+395%; Fig 5F2, ### $p < 0.0001$) were reduced (-101% for catalase mRNA) and totally blocked (catalase activity) in the brain of fetuses co-treated with ethanol plus PACAP. Similarly, Gpx-1, Gpx-7 and Atr mRNA levels were repressed in the brain of ethanol exposed animals (Fig 5 G1-2, by 15%, 9%, 58%, *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$), but increased above sham levels when animals were treated with both ethanol plus PACAP.

Ethanol exposure also resulted in a 4.5-fold increase in superoxydes in the brain of E18 fetuses, as measured with DHR123 fluorescence intensity (Fig 5I, *** $P < 0.001$), which was completely abolished in ethanol plus PACAP treated animals. The effects on oxidative stress markers led to further investigate lipid peroxidation, protein carbonylation and DNA damages. As shown on Fig 5 J1, MDA level was 10 times higher in ethanol exposed fetuses (Fig 5J1, *** $P < 0.001$) but back to Sham level in the brain of ethanol plus PACAP treated

animals. Likewise, the 4-fold increase in protein carbonyl content in animals exposed to ethanol was halved in animals co-treated with ethanol plus PACAP (Fig 5J3). The effect on protein carbonylation is accompanied by a 40% increase of Ctsb mRNA expression level in ethanol treated animals and a strong decrease of the gene expression in PACAP and ethanol plus PACAP treated animals (Fig. 5J2). Finally, the expression of the gene encoding for the DNA repair enzyme Parp1 is of 200% of control in the brain of ethanol treated animals, an increase reduced to 110% of control when animals are co-treated with ethanol plus PACAP (Fig 5J4).

Inflammation is not a key process in this model of prenatal binge-like drinking ethanol exposure

Oxidative damages are known to activate the inflammatory response. This prompts us to examine the effect ethanol exposure on Il6, Tnf alpha and Il1 beta mRNA expression. Surprisingly none of these proinflammatory genes was activated in the brain of E18 fetuses exposed to ethanol (Sup Fig 2). Likewise, the expression of the anti-inflammatory IL-10 was not repressed. The mRNA expression of Il6, Tnf alpha and Il1 beta was significantly reduced in PACAP treated animals but in a contradictory manner was increased in the brain of ethanol plus PACAP treated animals (Sup Fig 2).

PACAP inhibits apoptosis in the CNS of fetuses in a model of prenatal binge-like drinking ethanol exposure

Because PACAP treatment was not effective to prevent inflammation in ethanol exposed animals, it was decided to investigate its action on apoptosis (Fig 6). Related to its effects on oxidative stress, brain prenatal ethanol exposure induced more than a 10-fold decrease of Nrf2 mRNA expression, a transcription factor essential to prevent alcohol-induced oxidative damage ((Dong et al., 2008); Fig 6A1) and induced a 2-fold increase of Sp1, a transcription factor known to regulate ethanol-induced neuronal apoptosis in fetal brain ((Qi et al., 2014); Fig 6A2). On the other hand, Nrf2 and Sp1 expression level were back to control level in the brain of animals treated with ethanol plus PACAP (Fig 6A1-2). Regarding apoptosis, ethanol exposure induced a 2-fold decrease of Bcl-2 mRNA expression level which was blocked in the brain of animals treated with both ethanol and PACAP (Fig 6B1, *** $P < 0.001$ and ### $P < 0.001$), ethanol exposure induced a 70% increase of Bax mRNA expression level which was blocked in the brain of animals treated with both ethanol and PACAP (Fig 6B2, * $P < 0.05$ and # $P < 0.05$), ethanol exposure induced a 55% increase of

Cox4i1 mRNA expression level which was blocked in the brain of animals treated with both ethanol and PACAP (Fig 6B3, ** $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$), ethanol exposure induced a 10-fold increase of Caspase-9 mRNA expression level which was blocked in the brain of animals treated with both ethanol and PACAP (Fig 5C1, *** $P < 0.001$ and ### $P < 0.001$) and ethanol exposure induced a 4-fold increase of Caspase-3 mRNA expression level which was blocked in the brain of animals treated with both ethanol and PACAP (Fig 6C2, *** $P < 0.001$ and ### $P < 0.001$). Besides its effects on caspases gene expression, ethanol exposure induced a 2-fold increase of caspase-3 activity which was blocked in the brain of E18 fetuses treated with both ethanol and PACAP (Fig 6C3, *** $P < 0.001$ and ### $P < 0.001$). In accordance with these results we found that the lack of endogenous PACAP exacerbates oxidative stress and neuro-inflammation in the fetal brain of E18 animals exposed *in utero* to ethanol (Sup Fig 3. table A), which lead to ROS accumulation (Sup Fig 3B) and apoptosis (Sup Fig 3C) in the CNS of E18 fetuses. §§§ $P < 0.001$ versus wild-type ($cd^{+/+}$). && $P < 0.01$ versus heterozygous ($cd^{+/-}$).

Ethanol exposure has a very strong impact on the expression of PACAP and its receptors

The fact that PACAP is effective on some protective mechanisms but not all, prompt us to investigate the effect of prenatal ethanol exposure on the mRNA expression of the PACAPergic system in the E18 fetuses brain. The results revealed that *in utero* exposure to ethanol (1.5 g/kg) abolished the mRNA expression of PACAP by $160 \pm 10\%$ to $10 \pm 5\%$ increase in PACAP (5 μ g) treated fetuses and 100% to 15% decrease in ethanol exposure fetuses when compared to sham animals (Fig 7A1). Ethanol administration *in utero* (1.5 g/kg) decreased significantly the mRNA expression of PACAP receptors gene PAC1 (Fig 7A2, 50% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals), gene VPAC1 (Fig 7A3, 90% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals), gene VPAC2 (Fig 7A4, 70% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals). These results were confirmed by the important brain damages induced by ethanol in heterozygous ($cd^{+/-}$), and PACAP knockout ($cd^{-/-}$) fetus. In fact, ethanol (1 g/kg) *in utero* decreased significantly the mRNA expression of PACAP (Fig 7B1, 90% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals), its receptors gene PAC1 (Fig 7A2, 90% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals) gene VPAC1 (Fig 7A3, 80% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals), gene VPAC2 (Fig 7A4, 80% of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals). It is well known that PACAP and VIP display comparable affinity for the VPAC

receptors and that VIP exhibits also a potent trophic action on growth embryonic development in the CNS. We thus investigated the effect of prenatal exposure to ethanol on VIP mRNA expression both in the E18 fetus exposed to ethanol (1.5 g/kg) and on wild-type ($cd^{+/+}$), heterozygous ($cd^{+/-}$), and knockout PACAP ($cd^{-/-}$) fetus exposed to ethanol (1 g/kg). We found that ethanol decreased VIP gene expression (Fig sup 4A, ± 85 % of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals), and (Fig sup 4B, ± 65 % of decrease in ethanol exposed fetuses when compared to sham animals).

Discussion

Neurotrophic and neuroprotective effects of PACAP in the developing brain

Evidence that PACAP is important for the growth of the embryo

Consistent with its expression from early stages of development (Sherwood et al., 2000; Vaudry and Arimura, 2003) and in agreement with metabolic studies conducted with PACAP deficient mice (Adams et al., 2008), PACAP injection have been shown to exert trophic effects, leading to increased body weight. VIP also promotes early embryonic growth (Gressens et al., 1993, 1994), suggesting that VPAC receptors are involved in embryonic development. The involvement of VPAC receptors is probably even predominant in the overall effect of PACAP on the growth of the embryo, since animals overexpressing the PAC1 receptor exhibit strong growth retardation (Lang et al., 2006).

At the brain level, PACAP exerts neurotrophic effects during development (Botia et al., 2007; Ogata et al., 2015). Nevertheless, the action of PACAP is complex, since it promotes proliferation of neural precursors in the ventricular zone of E9.5 mouse cortex, but exerts anti-mitogenic actions at E13.5 following a change in expression of the splicing variants of the PAC1 receptor (Yan et al., 2013). PACAP not only acts on neurons but also causes astrocytes differentiation (Vallejo and Vallejo, 2002). Furthermore, our results show that it promotes angiogenesis in the developing cerebral cortex. Altogether these effects explain the increase in the thickness of the IZ and SVZ/VZ observed at the histological level, which are consistent with the neurotrophic action of PACAP on cerebellar granule neurons (Allais et al., 2007) and its ability to increase the thickness of the internal granule cell layer in the rodent cerebellum (Vaudry et al., 1999).

PACAP can exert its neurotrophic activity by promoting the proliferation and/or differentiation of neural precursors (Deutsch and Sun, 1992; Gonzalez et al., 1997; Nicot and DiCicco-Bloom, 2001). PACAP effects can be direct through the expression of genes such as Gli-1 or Egr-1 (Nicot et al., 2002) but as shown in the present study, PACAP can also induce the release of the neurotrophic factor BDNF (Ogata et al., 2015), which probably potentiates the effect of the peptide on neurite outgrowth (Ogata et al., 2015). The action of PACAP on FGF may contribute to switch the growth action of the peptide from a pro-mitogenic to an anti-mitotic activity in some brain areas (Lelievre et al., 2002). The increase by PACAP of VEGFa and VEGFb may contribute to the neural and vascular development that were

observed in E18 embryos (Darland et al., 2011). The stimulation by PACAP of IGF expression could through transactivation reinforce the activation of the PAC1 receptor (Delcourt et al., 2007). This may explain how daily injections of a molecule with a very short half-life (Darland et al., 2011) exert notable trophic activity. This also helps to understand how short exposure to PACAP induces long lasting protective effects in some pathological models (Wong and Marín, 2019).

Only a fraction of the neurons generated during embryonic development survive (Wong and Marín, 2019). Nevertheless, in our experiments, PACAP had no or little effect on genes involved in oxidative stress and apoptosis. Only the expression of few genes such as Gpx7, GSH, Ctsb, Bax and Cox411, involved in the regulation of oxidative damages and apoptosis were repressed (Crunkhorn, 2012).

Protective effects of PACAP in a FAS model

Besides the trophic effect of PACAP, its ability to protect from ethanol toxicity in a FAS model was also investigated. An important aspect is that PACAP decreased the abortion rate, which shows that PACAP is important for embryo implantation as already proposed (Somoskői et al., 2020).

As previously reported in various other FAS models (Sokol and Clarren, 1989), prenatal ethanol exposure from E7 to E18, induced growth retardation and brain atrophy (Ikonomidou et al., 2000) which were partially reduced by PACAP treatment. Interestingly, PACAP effect on the brain is probably not simply the consequence of its neurotrophic activity since its mechanisms of action are different. Indeed, PACAP alone had no effect on GDNF expression but strongly stimulated mRNA level in ethanol treated animals. In the same way, PACAP strongly reduced ethanol induced oxidative stress and apoptosis. It should be noticed that endogenous PACAP contributes to stimulate the expression of neurotrophic and neuroprotective factors, the level of which is always lower in KO animals than in wild type littermates in ethanol exposed fetuses. However, the results obtained with PACAP heterozygous mice on GDNF, FGF and BDNF expression suggest that some protective mechanisms may be activated in the presence of very low levels of PACAP whereas some other would require higher levels of the peptide. Indeed, in heterozygous mice exposed to ethanol, GDNF expression level are similar to the level observed in wild type animals when BDNF expression level are similar to the level observed in PACAP KO animals.

The neuroprotective effect of PACAP has already been reported in a model of ethanol exposure during postnatal cerebellar development (Botia et al., 2011) and in a model of binge drinking (Lacaille et al., 2017). The present study highlights that PACAP not only protects neurons but also astrocytes and endothelial cells from ethanol toxicity. Indeed, PACAP totally blocked the radial vasculature disorganization observed in ethanol exposed mice and FAS patients (Jégou et al., 2012). These protective effects of PACAP are probably due to its ability to strongly increase VEGFa and VEGFb mRNA expression, since Vegf administration could block ethanol toxicity on endothelial cells (Jégou et al., 2012). Such beneficial effects of PACAP on the vascular system may also be found in other pathological models such as in stroke models, where PACAP was shown to increase VEGFa mRNA expression (Cherait et al., 2020).

Nevertheless, even if there is a definite improvement in the organization of the cortical layers as shown with NeuN labeling, the reactional glia based on the GFAP expression or the vessel number measured in transplacental fetal brains and if PACAP strongly counteracted the deleterious effects of ethanol on the expression of neurotrophic factors, oxidative mechanisms and apoptotic pathway, its ability to block ethanol induced brain atrophy is only partial as shown when measuring the thickness of vessel cortical layer for example. This may be due to the fact that if PACAP alone inhibits the expression of pro-inflammatory factors such as Tnf- α or Il1- β , as expected from the literature (Delgado et al., 2003; Kim et al., 2000), in animals exposed to ethanol, it would instead tend to increase it.

Prenatal ethanol exposure deregulates the expression of endogenous PACAP and of its receptors

This unexpected effect of PACAP on the inflammatory response could find an answer in the effects of ethanol and PACAP on the expression of PACAP and of its three receptors. Indeed, if PACAP injection blocked the ethanol induced inhibition of PACAP, of PAC1 and of VPAC2, it did not improve the expression of the VPAC1, which is known to play a key role in the inflammatory response (Leceta et al., 2006). The fact that the PAC1 receptor is restored in animals treated with PACAP explains the very strong effect of PACAP on ethanol induced oxidative stress and apoptosis.

The collapse in the expression of PACAP and its receptors is probably a key element in the toxicity of ethanol in this FAS model. Indeed, it is now established that endogenous PACAP protects cells from various insults (Chen et al., 2006; Lacaille et al., 2017; Ohtaki et

al., 2006) as confirmed in the present study where PACAP KO animals exposed to ethanol exhibit increased ROS levels and enhanced caspase-3 activity when compared to wild type animals. These results together with the measurements conducted with PACAP KO animals, also suggest that the marked decrease of neurotrophic factors expression such as GDNF would at least be in part the consequence of the very strong inhibition of PACAP expression.

Just like for PACAP, the expression of VIP mRNA also collapsed in ethanol exposed animals, which may contribute to the observed embryo growth retardation and microcephaly, as observed in animals treated with a VIP antagonist (Gressens et al., 1994). As for neurotrophic genes, the level of VIP mRNA seems highly correlated with the expression level of PACAP.

Use of PACAP as a diagnosis biomarker of FAS and or as a therapeutic tool for subsequent treatment?

Fetal alcohol exposure is the most common known cause of preventable mental retardation and the best treatment is abstinence (Stevenson et al., 1996). Nevertheless, FAS remains a global health issue estimated to be around 14.6 per 10 000 in North America (Popova et al., 2017) and remains the leading known cause of mental retardation (Green et al., 2007; Lebel et al., 2011; Lewis et al., 2015). The early detection of SAF children is therefore very important in order to offer them appropriate care. As the physical malformations and growth retardation characteristic of FAS children only allow to identify the hidden side of the iceberg, the use of relevant biomarkers to detect FAS is necessary (Chabenne et al., 2014). In this context, one can wonder if PACAP expression level should be added to a panel of other biomarkers which could contribute to diagnose FAS children. In addition to PACAP, the expression of GDNF, IGF or TGF, that we found highly repressed, could help establish a signature of in utero alcohol exposure, together with other neurotrophic factors already identified such as PLGF (Lecuyer et al., 2017). However, this requires to determine whether the decreases of mRNA levels observed in the brain of E18 fetuses leads to a lasting impairment of the peptide or protein levels in plasma in order to consider an easy analysis that can be implemented on a large scale.

The other question concerns the possible use of PACAP for treatment of SAF children. As ethanol exposure during brain development leads to long lasting dysregulation of its oxidative stress status (Brocardo et al., 2017), it should be investigated if PACAP administration after birth could stop this phenomenon. In addition to this, it will be important

to determine if the alteration of PACAP and PACAP receptors expression is transient or lasting, as this could explain why the brain of FAS people is more vulnerable at adulthood to neurological insults such as to stroke (Bake et al., 2017).

Finally, human studies have identified diverging alcohol concentrations in the maternal blood, fetal blood, and amniotic fluid during mid to late pregnancy (Brien et al., 1983; Heller and Burd, 2014; Zelner and Koren, 2013). Thus, it will be important to use PACAP as a potential molecular biomarker for FAS. Interestingly, the analyze of differential PACAP rate variation taken from pregnant in amniotic fluid or plasma through prenatal test such as amniocentesis would be extremely beneficial to our understanding of the PACAP's physiological role and development of potential new treatments. Within these ideas, we believe that PACAP (either alone or in combination with other therapies) is a strong candidate for the design of clinical trials in FAS affected children.

References

- Abad, C., and Waschek, J.A. (2011). Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 1025–1035.
- Adams, B.A., Gray, S.L., Isaac, E.R., Bianco, A.C., Vidal-Puig, A.J., and Sherwood, N.M. (2008). Feeding and Metabolism in Mice Lacking Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Endocrinology* *149*, 1571–1580.
- Allais, A., Burel, D., Isaac, E.R., Gray, S.L., Basille, M., Ravni, A., Sherwood, N.M., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2007). Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 2604–2618.
- Bake, S., Gardner, R., Tingling, J.D., Miranda, R.C., and Sohrabji, F. (2017). Fetal alcohol exposure alters blood flow and neurological responses to transient cerebral ischemia in adult mice. *Alcohol Clin Exp Res* *41*, 117–127.
- Bhave, S.V., and Hoffman, P.L. (2002). Ethanol Promotes Apoptosis in Cerebellar Granule Cells by Inhibiting the Trophic Effect of NMDA. *Journal of Neurochemistry* *68*, 578–586.
- Botia, B., Basille, M., Allais, A., Raoult, E., Falluel-Morel, A., Galas, L., Jolivel, V., Wurtz, O., Komuro, H., Fournier, A., et al. (2007). Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* *28*, 1746–1752.
- Botia, B., Jolivel, V., Burel, D., Le Joncour, V., Roy, V., Naassila, M., Bénard, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Neuroprotective Effects of PACAP Against Ethanol-Induced Toxicity in the Developing Rat Cerebellum. *Neurotox Res* *19*, 423–434.
- Brien, J.F., Loomis, C.W., Tranmer, J., and McGrath, M. (1983). Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* *146*, 181–186.

- Brifault, C., Gras, M., Liot, D., May, V., Vaudry, D., and Wurtz, O. (2015). Delayed Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide Delivery After Brain Stroke Improves Functional Recovery by Inducing M2 Microglia/Macrophage Polarization. *Stroke* *46*, 520–528.
- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., Wortman, R., Noonan, A., McGinnis, E., Patten, A.R., and Christie, B.R. (2017). The Effects of Ethanol Exposure During Distinct Periods of Brain Development on Oxidative Stress in the Adult Rat Brain. *Alcohol Clin Exp Res* *41*, 26–37.
- Cazillis, M., Gonzalez, B.J., Billardon, C., Lombet, A., Fraichard, A., Samarut, J., Gressens, P., Vaudry, H., and Rostène, W. (2004). VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 798–808.
- Chabenne, A., Moon, C., Ojo, C., Khogali, A., Nepal, B., and Sharma, S. (2014). Biomarkers in fetal alcohol syndrome. *Biomarkers and Genomic Medicine* *6*, 12–22.
- Chen, Y., Samal, B., Hamelink, C.R., Xiang, C.C., Chen, Y., Chen, M., Vaudry, D., Brownstein, M.J., Hallenbeck, J.M., and Eiden, L.E. (2006). Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regulatory Peptides* *137*, 4–19.
- Cherait, A., Maucotel, J., Lefranc, B., Leprince, J., and Vaudry, D. (2020). Intranasal administration of PACAP is an efficient delivery route to reduce infarct volume and promote functional recovery after transient and permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). *Front. Endocrinol.* *11*.
- Chu, J., Tong, M., and de la Monte, S.M. (2007). Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol.* *113*, 659–673.
- Climont, E., Pascual, M., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (2002). Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* *68*, 213–225.
- Crunkhorn, S. (2012). Deal watch: Abbott boosts investment in NRF2 activators for reducing oxidative stress. *Nature Reviews. Drug Discovery* *11*, 96.

- Cuzon, V.C., Yeh, P.W.L., Yanagawa, Y., Obata, K., and Yeh, H.H. (2008). Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J. Neurosci.* 28, 1854–1864.
- Darland, D.C., Cain, J.T., Berosik, M.A., Saint-Geniez, M., Odens, P.W., Schaubhut, G.J., Frisch, S., Stemmer-Rachamimov, A., Darland, T., and D'Amore, P.A. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform regulation of early forebrain development. *Developmental Biology* 358, 9–22.
- Delcourt, N., Thouvenot, E., Chanrion, B., Galéotti, N., Jouin, P., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J* 26, 1542–1551.
- Delgado, M., Leceta, J., and Ganea, D. (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 73, 155–164.
- Deutsch, P.J., and Sun, Y. (1992). The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 267, 5108–5113.
- Dong, J., Sulik, K.K., and Chen, S. (2008). Nrf2-Mediated Transcriptional Induction of Antioxidant Response in Mouse Embryos Exposed to Ethanol *in vivo*: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* 10, 2023–2033.
- Dong, J., Sulik, K.K., and Chen, S. (2010). The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicology Letters* 193, 94–100.
- Douiri, S., Bahdoudi, S., Hamdi, Y., Cubi, R., Basille, M., Fournier, A., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., Vaudry, D., et al. (2016). Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 137, 913–930.

- Dragan, W.Ł., Czerski, P.M., and Dragan, M. (2017). PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype and problematic alcohol use in a sample of young women. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1483–1489.
- Draper, H.H., and Hadley, M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 20, 901–907.
- Falluel-Morel, A., Aubert, N., Vaudry, D., Basille, M., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2004). Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 91, 1231–1243.
- Falluel-Morel, A., Tascau, L.I., Sokolowski, K., Brabet, P., and DiCicco-Bloom, E. (2008). Granule Cell Survival is Deficient in PAC1^{-/-} Mutant Cerebellum. *J Mol Neurosci* 36, 38–44.
- Ferraguti, G., Merlino, L., Battagliese, G., Piccioni, M.G., Barbaro, G., Carito, V., Messina, M.P., Scalese, B., Coriale, G., Fiore, M., et al. (2020). Fetus morphology changes by second-trimester ultrasound in pregnant women drinking alcohol. *Addiction Biology* 25.
- Floyd, R.A., and Carney, J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 32 Suppl, S22-27.
- Ghouili, I., Bahdoudi, S., Morin, F., Amri, F., Hamdi, Y., Coly, P.M., Walet-Balieu, M.-L., Leprince, J., Zekri, S., Vaudry, H., et al. (2018). Endogenous Expression of ODN-Related Peptides in Astrocytes Contributes to Cell Protection Against Oxidative Stress: Astrocyte-Neuron Crosstalk Relevance for Neuronal Survival. *Mol Neurobiol* 55, 4596–4611.
- Gil-Mohapel, J., Boehme, F., Kainer, L., and Christie, B.R. (2010). Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Res Rev* 64, 283–303.

- Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78, 419–430.
- Green, M.L., Singh, A.V., Zhang, Y., Nemeth, K.A., Sulik, K.K., and Knudsen, T.B. (2007). Reprogramming of genetic networks during initiation of the Fetal Alcohol Syndrome. *Developmental Dynamics* 236, 613–631.
- Gressens, P., Lammens, M., Picard, J.J., and Evrard, P. (1992). Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol Alcohol.* 27, 219–226.
- Gressens, P., Hill, J.M., Gozes, I., Fridkin, M., and Brenneman, D.E. (1993). Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature* 362, 155–158.
- Gressens, P., Hill, J.M., Painsaveine, B., Gozes, I., Fridkin, M., and Brenneman, D.E. (1994). Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *J Clin Invest* 94, 2020–2027.
- Guizzetti, M., Zhang, X., Goeke, C., and Gavin, D.P. (2014). Glia and Neurodevelopment: Focus on Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Front Pediatr* 2.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97, 1634–1658.
- Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D., Leprince, J., Zarrouk, A., Hammami, M., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., and Masmoudi-Kouki, O. (2015). Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides* 71, 56–65.
- Hamdi, Y., Madfai, H., Belhareth, R., Mokni, M., Masmoudi-Kouki, O., and Amri, M. (2016). Prenatal exposure to cigarette smoke enhances oxidative stress in astrocytes of neonatal rat. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26, 231–237.

- Handmaker, N.S., Rayburn, W.F., Meng, C., Bell, J.B., Rayburn, B.B., and Rappaport, V.J. (2006). Impact of Alcohol Exposure After Pregnancy Recognition on Ultrasonographic Fetal Growth Measures. *Alcoholism Clin Exp Res* 30, 892–898.
- Hashimoto, H., Shintani, N., Tanaka, K., Mori, W., Hirose, M., Matsuda, T., Sakaue, M., Miyazaki, J., Niwa, H., Tashiro, F., et al. (2001). Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13355–13360.
- Heller, M., and Burd, L. (2014). Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100, 277–283.
- Henderson, G.I., Devi, B.G., Perez, A., and Schenker, S. (1995). In Utero Ethanol Exposure Elicits Oxidative Stress in the Rat Fetus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19, 714–720.
- Heyne, G.W., Melberg, C.G., Doroodchi, P., Parins, K.F., Kietzman, H.W., Everson, J.L., Ansen-Wilson, L.J., and Lipinski, R.J. (2015). Definition of critical periods for Hedgehog pathway antagonist-induced holoprosencephaly, cleft lip, and cleft palate. *PLoS One* 10, e0120517.
- Hicks, S.D., Middleton, F.A., and Miller, M.W. (2010). Ethanol-induced methylation of cell cycle genes in neural stem cells. *Journal of Neurochemistry* 114, 1767–1780.
- Hoshino, M., Li, M., Zheng, L.Q., Suzuki, M., Mochizuki, T., and Yanaihara, N. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide and vasoactive intestinal polypeptide: differentiation effects on human neuroblastoma NB-OK-1 cells. *Neuroscience Letters* 159, 35–38.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., et al. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
- Ito, Y., Arakawa, M., Ishige, K., and Fukuda, H. (1999). Comparative study of survival signal withdrawal- and 4-hydroxynonenal-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuroscience Research* 35, 321–327.

- Jacobs, J.S., and Miller, M.W. (2001). Proliferation and death of cultured fetal neocortical neurons: effects of ethanol on the dynamics of cell growth. *J. Neurocytol.* 30, 391–401.
- Jégou, S., Ghazi, F.E., Lendeu, P.K. de, Marret, S., Laudenbach, V., Uguen, A., Marcorelles, P., Roy, V., Laquerrière, A., and Gonzalez, B.J. (2012). Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain. *Annals of Neurology* 72, 952–960.
- Jones, K.L., and Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302, 999–1001.
- Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P.G., and Juurlink, B.H.J. (2000). Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry* 286, 35–37.
- Kim, W.-K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R.P., Gozes, I., and Jonakait, G.M. (2000). Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Inhibit Tumor Necrosis Factor- α Production in Injured Spinal Cord and in Activated Microglia via a cAMP-Dependent Pathway. *J Neurosci* 20, 3622–3630.
- Komada, M., Hara, N., Kawachi, S., Kawachi, K., Kagawa, N., Nagao, T., and Ikeda, Y. (2017). Mechanisms underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol. *Scientific Reports* 7, 4934.
- Kumada, T., Lakshmana, M.K., and Komuro, H. (2006). Reversal of Neuronal Migration in a Mouse Model of Fetal Alcohol Syndrome by Controlling Second-Messenger Signalings. *J. Neurosci.* 26, 742–756.
- Lacaille, H., Duterte-Boucher, D., Liot, D., Vaudry, H., Naassila, M., and Vaudry, D. (2015). Comparison of the deleterious effects of binge drinking-like alcohol exposure in adolescent and adult mice. *J. Neurochem.* 132, 629–641.

- Lacaille, H., Duterte-Boucher, D., Vaudry, H., Zerdoumi, Y., Flaman, J.-M., Hashimoto, H., and Vaudry, D. (2017). PACAP Protects the Adolescent and Adult Mice Brain from Ethanol Toxicity and Modulates Distinct Sets of Genes Regulating Similar Networks. *Mol Neurobiol* 54, 7534–7548.
- Lang, B., Song, B., Davidson, W., MacKenzie, A., Smith, N., McCaig, C.D., Harmar, A.J., and Shen, S. (2006). Expression of the human PAC1 receptor leads to dose-dependent hydrocephalus-related abnormalities in mice. *J. Clin. Invest.* 116, 1924–1934.
- Lebel, C., Roussotte, F., and Sowell, E.R. (2011). Imaging the Impact of Prenatal Alcohol Exposure on the Structure of the Developing Human Brain. *Neuropsychol Rev* 21, 102–118.
- Leceta, J., Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Ganea, D., and Delgado, M. (2006). Receptors and Transcriptional Factors Involved in the Anti-Inflammatory Activity of VIP and PACAP. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 92–102.
- Lecuyer, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., and Gonzalez, B.J. (2017). PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathologica Communications* 5, 44.
- Lee, R.D., An, S.M., Kim, S.S., Rhee, G.S., Kwack, S.J., Seok, J.H., Chae, S.Y., Park, C.H., Choi, Y.W., Kim, H.S., et al. (2005). Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 2147–2162.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.-Y., Ioffe, Y., and Waschek, J.A. (2002). Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J. Neurosci. Res.* 67, 566–573.
- Lewis, C.E., Thomas, K.G.F., Dodge, N.C., Molteno, C.D., Meintjes, E.M., Jacobson, J.L., and Jacobson, S.W. (2015). Verbal Learning and Memory Impairment in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 724–732.
- Maier, S.E., and West, J.R. (2001). Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* 23, 49–57.

- Maier, S.E., Cramer, J.A., West, J.R., and Sohrabji, F. (1999a). Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb. *J. Neurobiol.* *41*, 414–423.
- Maier, S.E., Miller, J.A., Blackwell, J.M., and West, J.R. (1999b). Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *23*, 726–734.
- Mercer, K.B., Dias, B., Shafer, D., Maddox, S.A., Mullen, J.G., Hu, P., Walton, J., and Ressler, K.J. (2016). Functional evaluation of a PTSD-associated genetic variant: estradiol regulation and ADCYAP1R1. *Transl Psychiatry* *6*, e978.
- Miller, M.W. (1988). Effect of Prenatal Exposure to Ethanol on the Development of Cerebral Cortex: I. Neuronal Generation. *Alcoholism Clin Exp Res* *12*, 440–449.
- Miller, M.W., and Robertson, S. (1993). Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J. Comp. Neurol.* *337*, 253–266.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., and Coy, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *164*, 567–574.
- Nicot, A., and DiCicco-Bloom, E. (2001). Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4758–4763.
- Nicot, A., Lelièvre, V., Tam, J., Waschek, J.A., and DiCicco-Bloom, E. (2002). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Sonic Hedgehog Interact to Control Cerebellar Granule Precursor Cell Proliferation. *J. Neurosci.* *22*, 9244–9254.
- Ogata, K., Shintani, N., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Higashi, S., Seiriki, K., Momosaki, H., Vaudry, D., Vaudry, H., Galas, L., et al. (2015). PACAP Enhances Axon Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons to a Comparable Extent as BDNF. *PLoS One* *10*.

- Ogony, J.W., Malahias, E., Vadigepalli, R., and Anni, H. (2013). Ethanol Alters the Balance of Sox2, Oct4, and Nanog Expression in Distinct Subpopulations During Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development* 22, 2196–2210.
- Ohno, F., Watanabe, J., Sekihara, H., Hirabayashi, T., Arata, S., Kikuyama, S., Shioda, S., Nakaya, K., and Nakajo, S. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul. Pept.* 126, 115–122.
- Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Aizawa, Y., Takaki, A., Hodoyama, K., Yofu, S., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., et al. (2006). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *PNAS* 103, 7488–7493.
- Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P., and Ikonomidou, C. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis* 5, 515–521.
- Palkovits, M., Somogyvári-Vigh, A., and Arimura, A. (1995). Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699, 116–120.
- Popova, S., Lange, S., Probst, C., Parunashvili, N., and Rehm, J. (2017). Prevalence of alcohol consumption during pregnancy and Fetal Alcohol Spectrum Disorders among the general and Aboriginal populations in Canada and the United States. *European Journal of Medical Genetics* 60, 32–48.
- Qi, Y., Zhang, M., Li, H., Frank, J.A., Dai, L., Liu, H., and Chen, G. (2014). MicroRNA-29b Regulates Ethanol-induced Neuronal Apoptosis in the Developing Cerebellum through SP1/RAX/PKR Cascade. *J. Biol. Chem.* 289, 10201–10210.
- Radek, K.A., Matthies, A.M., Burns, A.L., Heinrich, S.A., Kovacs, E.J., and DiPietro, L.A. (2005). Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H1084–H1090.

- Radek, K.A., Kovacs, E.J., Gallo, R.L., and DiPietro, L.A. (2008). Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295, H174–H184.
- Raghunathan, R., Wu, C., Singh, M., Liu, C.-H., Miranda, R.C., and Larin, K.V. (2018). Evaluating the effects of maternal alcohol consumption on murine fetal brain vasculature using optical coherence tomography. *J. Biophotonics* 11, e201700238.
- Ramachandran, V., Perez, A., Chen, J., Senthil, D., Schenker, S., and Henderson, G.I. (2001). In Utero Ethanol Exposure Causes Mitochondrial Dysfunction, Which Can Result in Apoptotic Cell Death in Fetal Brain: A Potential Role for 4-Hydroxynonenal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25, 862–871.
- Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A., and Tamas, A. (2011). Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 17, 962–972.
- Reglodi, D., Kiss, P., Szabadfi, K., Atlasz, T., Gabriel, R., Horvath, G., Szakaly, P., Sandor, B., Lubics, A., Laszlo, E., et al. (2012). PACAP is an endogenous protective factor—insights from PACAP-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* 48, 482–492.
- Reglodi, D., Helyes, Z., Nemeth, J., Vass, R.A., and Tamas, A. (2016). PACAP as a Potential Biomarker: Alterations of PACAP Levels in Human Physiological and Pathological Conditions. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, D. Reglodi, and A. Tamas, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 815–832.
- Ross, R.A., Hoepfner, S.S., Hellberg, S.N., O’Day, E.B., Rosencrans, P.L., Ressler, K.J., May, V., and Simon, N.M. (2020). Circulating PACAP peptide and PAC1R genotype as possible transdiagnostic biomarkers for anxiety disorders in women: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology* 45, 1125–1133.
- Saito, M., Chakraborty, G., Hui, M., Masiello, K., and Saito, M. (2016). Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain. *Brain Sciences* 6, 31.

- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Protective effects of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 204–214.
- Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., and McRory, J.E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* *21*, 619–670.
- Shintani, N., Suetake, S., Hashimoto, H., Koga, K., Kasai, A., Kawaguchi, C., Morita, Y., Hirose, M., Sakai, Y., Tomimoto, S., et al. (2005). Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regulatory Peptides* *126*, 123–128.
- Sokol, R.J., and Clarren, S.K. (1989). Guidelines for use of terminology describing the impact of prenatal alcohol on the offspring. *Alcohol Clin Exp Res* *13*, 597–598.
- Somogyvári-Vigh, A., and Reglodi, D. (2004). Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* *10*, 2861–2889.
- Somoskői, B., Török, D., Reglódi, D., Tamás, A., Fülöp, B.D., and Cseh, S. (2020). Possible effects of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) on early embryo implantation marker HB-EGF in mouse. *Reprod Biol* *20*, 9–13.
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Thompson, P.M., Jernigan, T.L., Riley, E.P., and Toga, A.W. (2001). Mapping callosal morphology and cognitive correlates: Effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology* *57*, 235–244.
- Stevenson, R.E., Massey, P.S., Schroer, R.J., McDermott, S., and Richter, B. (1996). Preventable fraction of mental retardation: analysis based on individuals with severe mental retardation. *Ment Retard* *34*, 182–188.
- Stumm, R., Kolodziej, A., Prinz, V., Endres, M., Wu, D.-F., and Höllt, V. (2007). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *Journal of Neurochemistry* *103*, 1666–1681.

- Suh, J., Lu, N., Nicot, A., Tatsuno, I., and DiCicco-Bloom, E. (2001). PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nature Neuroscience* 4, 123–124.
- Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N., Ohgane, J., Yanagimachi, R., and Shiota, K. (2001). Placentomegaly in Cloned Mouse Concepti Caused by Expansion of the Spongiotrophoblast Layer1. *Biology of Reproduction* 65, 1813–1821.
- Terasaki, L.S., and Schwarz, J.M. (2016). Effects of Moderate Prenatal Alcohol Exposure during Early Gestation in Rats on Inflammation across the Maternal-Fetal-Immune Interface and Later-Life Immune Function in the Offspring. *J Neuroimmune Pharmacol* 11, 680–692.
- Todd, D., Bonthius, D.J., Sabalo, L.M., Roghair, J., Karacay, B., Bousquet, S.L., and Bonthius, D.J. (2018). Regional Patterns of Alcohol-Induced Neuronal Loss Depend on Genetics: Implications for Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 42, 1627–1639.
- Tyler, C.R., and Allan, A.M. (2014). Prenatal alcohol exposure alters expression of neurogenesis-related genes in an ex vivo cell culture model. *Alcohol* 48, 483–492.
- Vallejo, I., and Vallejo, M. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 671–683.
- Vaudry, H., and Arimura, A. (2003). Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (Springer US).
- Vaudry, D., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9415–9420.
- Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., and Gonzalez, B.J. (2002a). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1451–1460.

- Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6398–6403.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Basille, M., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 72, 303–316.
- Vaudry, D., Hamelink, C., Damadzic, R., Eskay, R.L., Gonzalez, B., and Eiden, L.E. (2005). Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* 26, 2518–2524.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., et al. (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev* 61, 283–357.
- Waschek, J.A., Casillas, R.A., Nguyen, T.B., DiCicco-Bloom, E.M., Carpenter, E.M., and Rodriguez, W.I. (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9602–9607.
- Wass, T.S., Persutte, W.H., and Hobbins, J.C. (2001). The impact of prenatal alcohol exposure on frontal cortex development in utero. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 185, 737–742.
- Wong, F.K., and Marín, O. (2019). Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 35, 523–542.
- Xu, J., Yeon, J.E., Chang, H., Tison, G., Chen, G.J., Wands, J., and de la Monte, S. (2003). Ethanol impairs insulin-stimulated neuronal survival in the developing brain: role of PTEN phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278, 26929–26937.

Yan, Y., Zhou, X., Pan, Z., Ma, J., Waschek, J.A., and DiCicco-Bloom, E. (2013). Pro- and anti-mitogenic actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in developing cerebral cortex: potential mediation by developmental switch of PAC1 receptor mRNA isoforms. *J. Neurosci.* 33, 3865–3878.

Zelner, I., and Koren, G. (2013). Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 20, e259-265.

Figure legends

Fig 1. PACAP injection reduced morphological lesions induced by *in utero* ethanol exposure. (A) Visualization of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg), or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Quantification of E18 fetuses body weight (B), body length (C; yellow bar) and skull size (D; red bar). (E) Visualization of E18 fetal brain, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), PACAP (5 µg), EtOH (1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Quantification of E18 brain area (F) and brain weight (G). Data are expressed as mean (\pm SEM) for n = 10 animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$ versus SHAM.; ### $P < 0.0001$ versus EtOH. Scale bar = 1 cm.

Fig 2. Effect of PACAP on cerebral cortex histomorphology in the fetal brain of animals exposed *in utero* to ethanol. (A) Cresyl-violet stained coronal sections showing the cytoarchitecture of the forebrain cortical plate of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM, A1), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg, A2), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg, A3) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg; A4). Cx: cortex, Hip: hippocampus, St: striatum. (A5) Quantification in the forebrain of the cortical plate (CP), intermediate zone (IZ), subventricular and ventricular zone (SVZ/VZ) layer thicknesses after treatment with NaCl 0.9% (SHAM), PACAP, EtOH or both EtOH + PACAP. Scale bar = 50 µm (A1, A2, A3 and A4). (B) Immunohistochemistry with the *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP; green) and nuclear labeling with the 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; blue) of a E18 fetus coronal brain section showing with inserts the areas where images at larger magnification of NeuN (green signal; D) and GFAP (green signal; C) immunohistochemistry were acquired. (C) NeuN immunohistochemical signal in the forebrain cortical plate of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM, C1), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; C2), ethanol (EtOH; C3) or both EtOH + PACAP (C4). (D) GFAP immunohistochemical signal in the forebrain cortical plate of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM, D1), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; D2), ethanol (EtOH; D3) or both EtOH + PACAP (D4). (E) GFAP immunohistochemical signal in the subventricular and ventricular zone (SVZ/VZ) of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM, E1), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; E2), ethanol

(EtOH; E3) or both EtOH + PACAP (E4). Scale bar = 100 μ m (C, D and E). Data are expressed as mean (\pm SEM) for $n = 7$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance *** $P < 0.001$ versus SHAM. ## $P < 0.01$ versus EtOH.

Fig 3. PACAP enhanced the mRNA expression of some neurotrophic and angiogenic factors in the fetal brain of animals prenatally exposed to ethanol. (A) mRNA expression level of the neurotrophic factors *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF; A1), *fibroblast growth factors* (FGF; A2) and *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF; A3) in the brain of wild-type embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 μ g), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 μ g). (B) mRNA expression level of GDNF (B1), FGF (B2) and BDNF (B3) in the brain of E18 wild-type ($cd^{+/+}$), heterozygous ($cd^{+/-}$) or PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) fetuses, from pregnant mice treated with EtOH (1.5 g/kg). (C) mRNA expression level of the *vascular growth factors* a (VEGFa; C1), VEGFb (C2), *transforming growth factor* (TGF; C3) and *insulin-like growth factor-I* (IGF; C4) in the brain of wild-type E18 fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), PACAP (5 μ g), EtOH (1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 μ g). Data were normalized using the GAPDH, Actb, and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) for $n = 10$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.0001$ versus prenatal EtOH. ANOVA followed by one-way analysis of variance §§ $P < 0.01$; §§§ $P < 0.001$ versus wild-type ($cd^{+/+}$). && $P < 0.01$ versus heterozygous ($cd^{+/-}$).

Fig 4. PACAP improves cortical vasculature in the fetal brain of animals exposed *in utero* to ethanol. (A) Overview with a Zeiss CD7 of the microvascularization on a coronal brain section of embryonic day 18 (E18) fetuses after labeling with Isolectin GS-IB₄ from Griffonia simplicifolia coupled to Alexa Fluor™ 594 conjugate. The ROI corresponds to the area which was used for further analysis. (B) Representative images of the IB₄ staining used for the analysis of vascular parameters in the brain of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM; B1), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 μ g; B2), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg; B3) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 μ g; B4). Inserts correspond to a zoom of the cortical layer and arrows highlight the cortical microvessels profile for each treatment. Quantification of cortical vessel thickness (C), cortical microvessels mean diameter (D) and cortical microvessels distribution by class of angles in the brain of wild-type E18 fetuses, from

pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), PACAP (5 µg), EtOH (1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 15$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$; ### $P < 0.0001$ versus EtOH. Scale bar in A corresponds to 1 mm and in B corresponds to 100 µm

Fig 5. Effect of PACAP injection on oxidative stress markers in fetal brain of animals exposed *in utero* to ethanol. (A) Reactive oxygen species (ROS) level measured with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), DHE fluorescence intensity (B), mRNA expression level of iNOS (C1), NO production (C2), mRNA expression level of superoxide dismutase (SOD) isoenzyme Sod1 (D1), mRNA expression level of SOD isoenzyme Sod2 (D2), SOD activity (D3), hydrogen peroxide (H₂O₂) level (E), catalase activity (F1), mRNA expression level of catalase (F2), glutathione GSH level (H), DHR fluorescence intensity (I), lipid peroxidation reported as malondialdehyde (MDA) formation (J1), mRNA expression level of Ctsb (J2), protein carbonylation content (J3) and mRNA expression level of Parp1 in the brain of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Data were normalized using the GAPDH, Actb and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 5$ to 10 animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.0001$ versus EtOH.

Fig 6. Effect of PACAP injection on the intrinsic apoptotic cascade in the fetal brain of animals exposed *in utero* to ethanol. mRNA expression level of the Nuclear factor (Nrf2; A1), mRNA expression level of the transcription factor Sp1 (A2), mRNA expression level of Bcl-2 (B1), mRNA expression level of Bax (B2), mRNA expression level of Cox4i1 (B3), mRNA expression level of Caspase-9 (C1), mRNA expression level of Caspase-3 (C2) and Caspase-3 activity (C3) in the brain of embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Data were normalized using the GAPDH, Actb, and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) for $n = 10$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$, ### $P < 0.0001$ versus EtOH.

Fig 7. Effect of ethanol and PACAP on PACAP and its receptors gene expression in the fetal brain. (A) mRNA expression level of PACAP (A1), PAC1 (A2), VPAC1 (A3) and VPAC2 (A4) in the brain of wild-type embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH, 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). (B) mRNA expression level of PACAP (B1), PAC1 (B2), VPAC1 (B3) and VPAC2 (B4) in the brain of E18 wild-type ($cd^{+/+}$), heterozygous ($cd^{+/-}$) or PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) fetuses, from pregnant PACAP heterozygous mice treated with EtOH (1 g/kg). Data were normalized using the GAPDH, Actb, and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 15$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ versus EtOH.

Sup. Fig 1. Effect of ethanol and PACAP on pregnant mice. Survival rate (A), abortion rate (B) and body weight (C) of pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH; 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Pregnant mice were randomly assigned to one of four treatment groups, NaCl and EtOH were administered daily from E7 to E18 by intraperitoneal injection and PACAP was administered daily from E7 to E18 by intra-uterine injection. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 10$ animals / group.

Sup. Fig 2. Effect of ethanol and PACAP on pro- and anti-inflammatory and anti-gene expression in the fetal brain. mRNA expression level of pro-inflammatory cytokines Il-6 (A), TNF-alpha (B) and IL-1beta (C), and of anti-inflammatory cytokine IL-10 (D), in the brain of wild-type embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 µg), ethanol (EtOH, 1.5 g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 µg). Data were normalized using the GAPDH, Actb and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 15$ animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ versus SHAM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.0001$ versus EtOH.

Sup. Fig 3. The lack of endogenous PACAP exacerbates oxidative stress and neuro-inflammation in the fetal brain E18 of animals exposed *in utero* to ethanol. (A) List of the genes regulated in heterozygous ($cd^{+/-}$) and PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) fetuses, from pregnant PACAP heterozygous mice treated with EtOH (1 g/kg). Reactive oxygen species (ROS) level measured with 2', 7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA; B), in wild-type ($cd^{+/+}$),

heterozygous ($cd^{+/-}$) and PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) fetuses, from pregnant PACAP heterozygous mice treated with EtOH (1 g/kg). (C) Caspase-3 activity in wild-type ($cd^{+/+}$), heterozygous ($cd^{+/-}$) and PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) E18 fetuses, from pregnant PACAP heterozygous mice treated with EtOH (1 g/kg). Data were normalized using the GAPDH, Actb, and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 4$ to 5 animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance §§§ $P < 0.001$ versus wild-type ($cd^{+/+}$). &&& $P < 0.001$ versus heterozygous ($cd^{+/-}$).

Sup. Fig 4. Effect of ethanol and PACAP on VIP gene expression in the fetal brain(A) mRNA expression level of VIP in the brain of wild-type embryonic day 18 (E18) fetuses, from pregnant mice treated with NaCl 0.9% (SHAM), pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP; 5 μ g), ethanol (EtOH, 1.5g/kg) or both EtOH (1.5 g/kg) + PACAP (5 μ g). (B) mRNA expression level of VIP in the brain of E18 wild-type ($cd^{+/+}$), heterozygous ($cd^{+/-}$) or PACAP-deficient ($cd^{-/-}$) fetuses, from pregnant mice treated with EtOH (1 g/kg). Data were normalized using the GAPDH, Actb, and Ppia housekeeping genes as internal controls. Data are expressed as mean (\pm SEM) from $n = 4$ to 6 animals / group. ANOVA followed by one-way analysis of variance §§ $P < 0.01$; §§§ $P < 0.001$ versus wild-type ($cd^{+/+}$). && $P < 0.01$ versus heterozygous ($cd^{+/-}$).

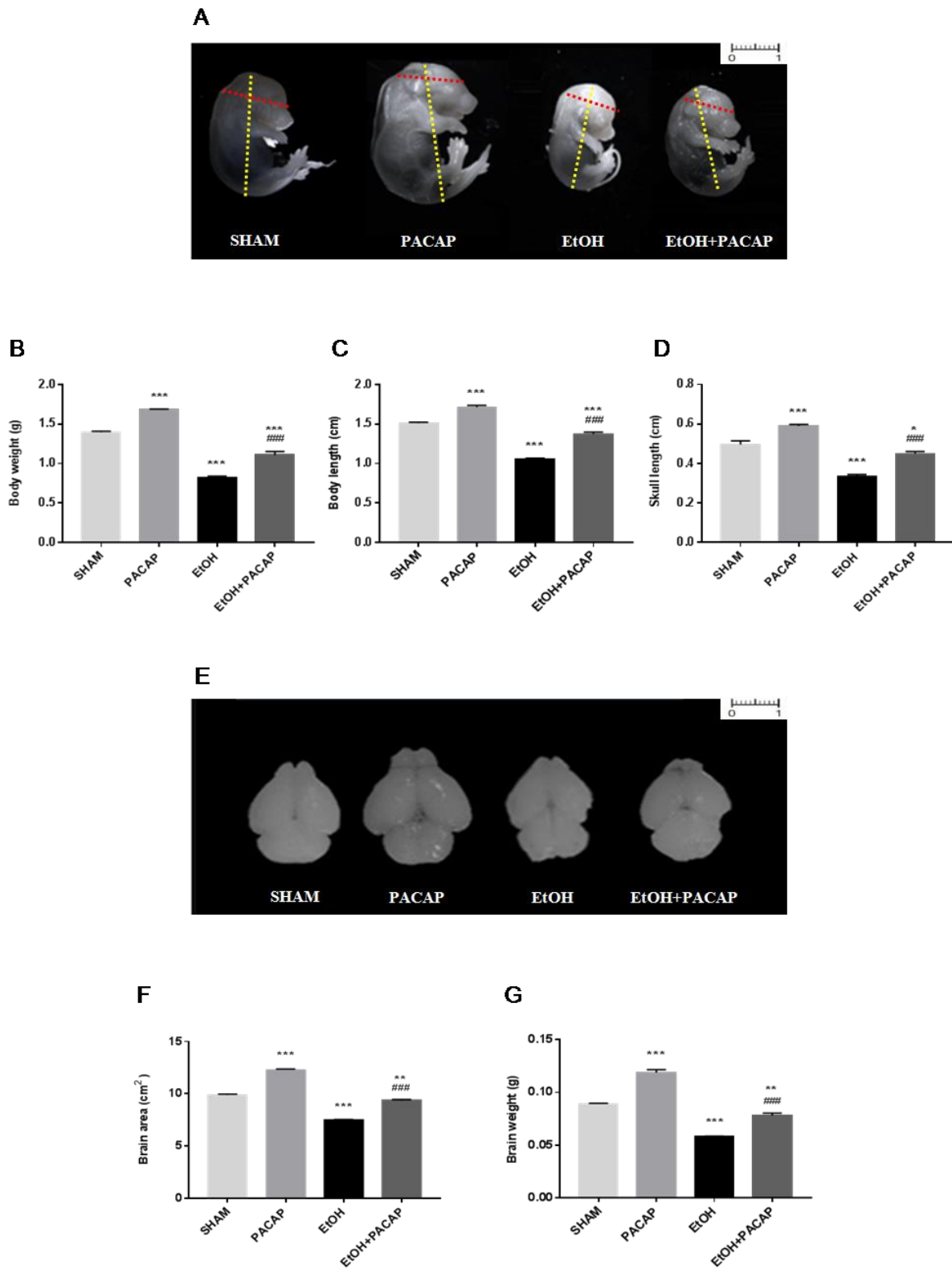


Figure 1

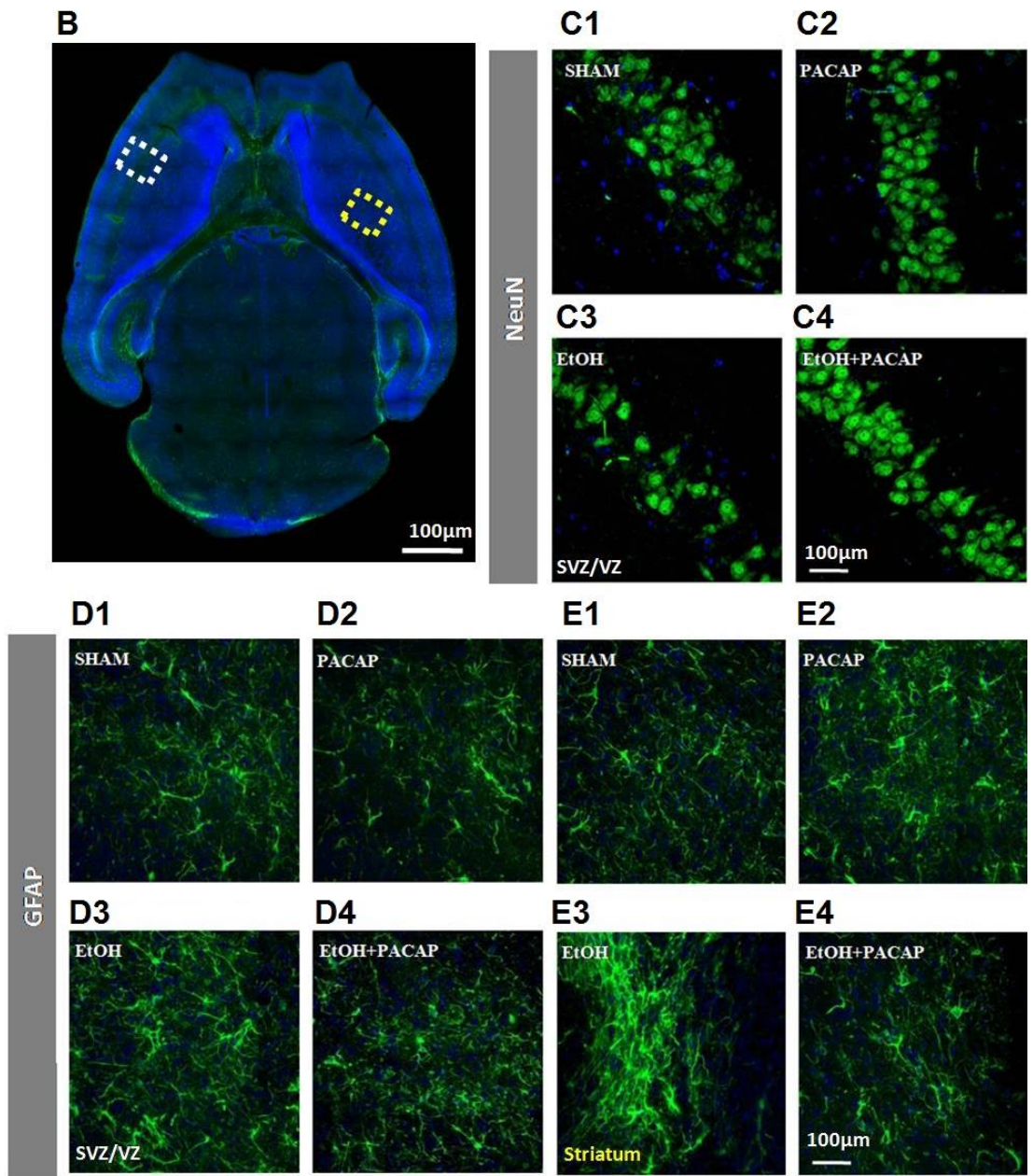
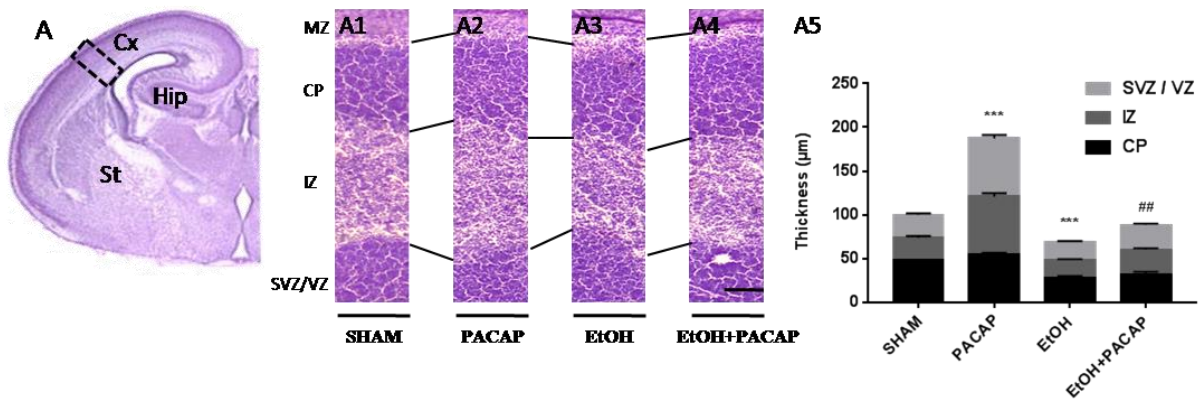


Figure 2

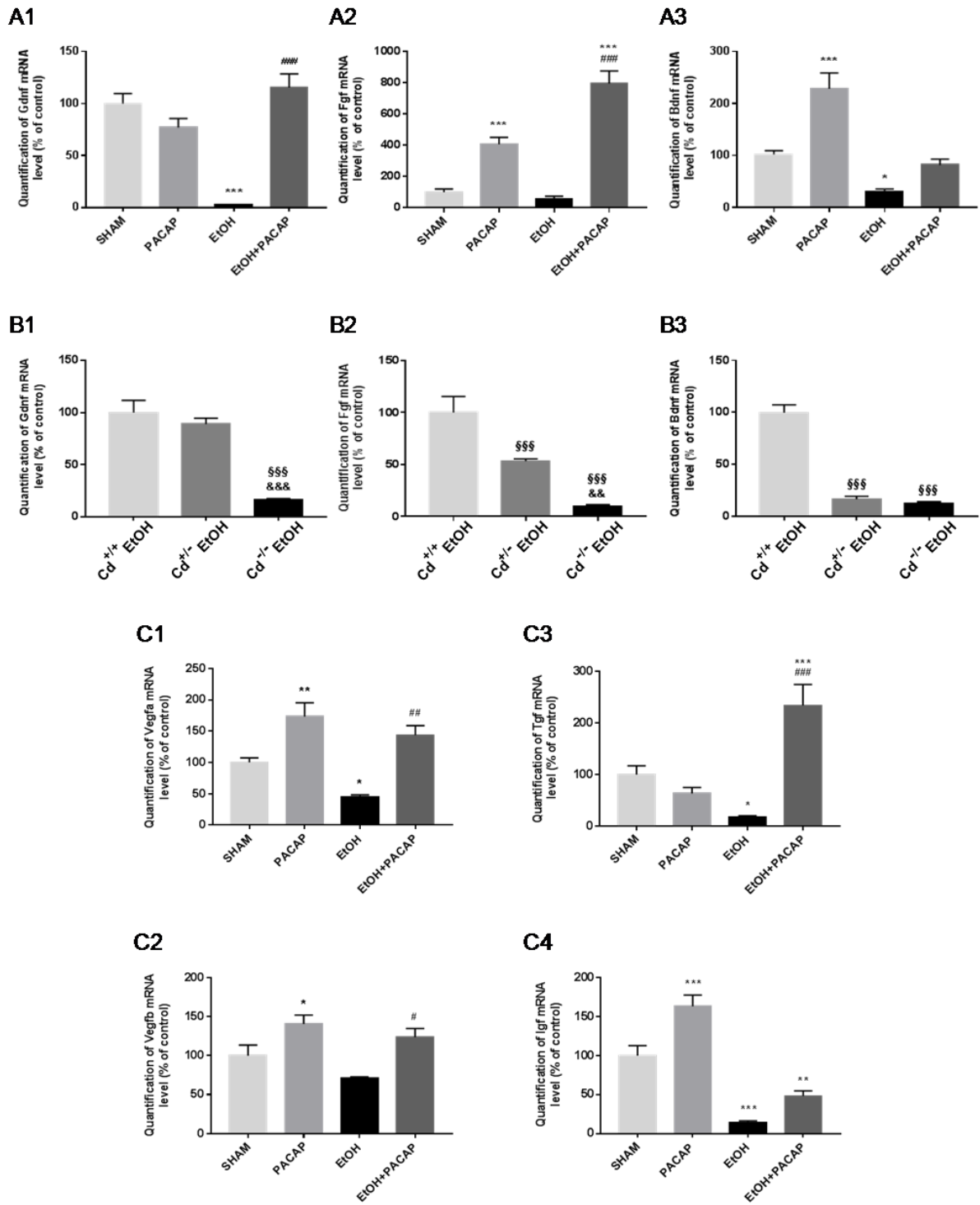


Figure 3

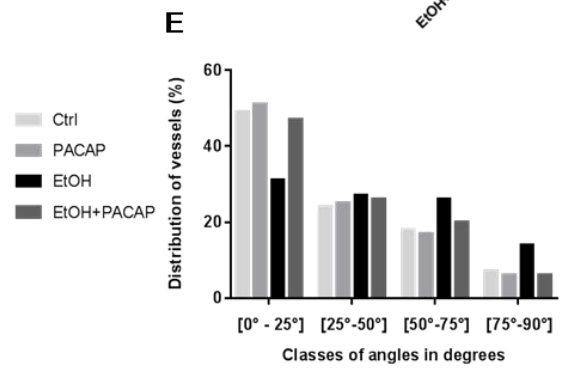
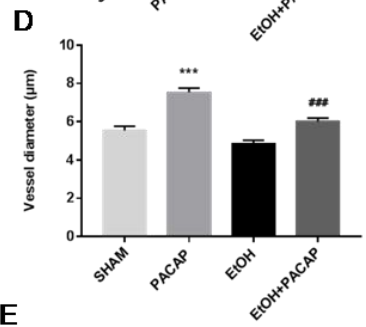
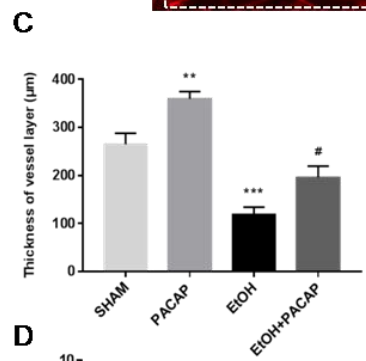
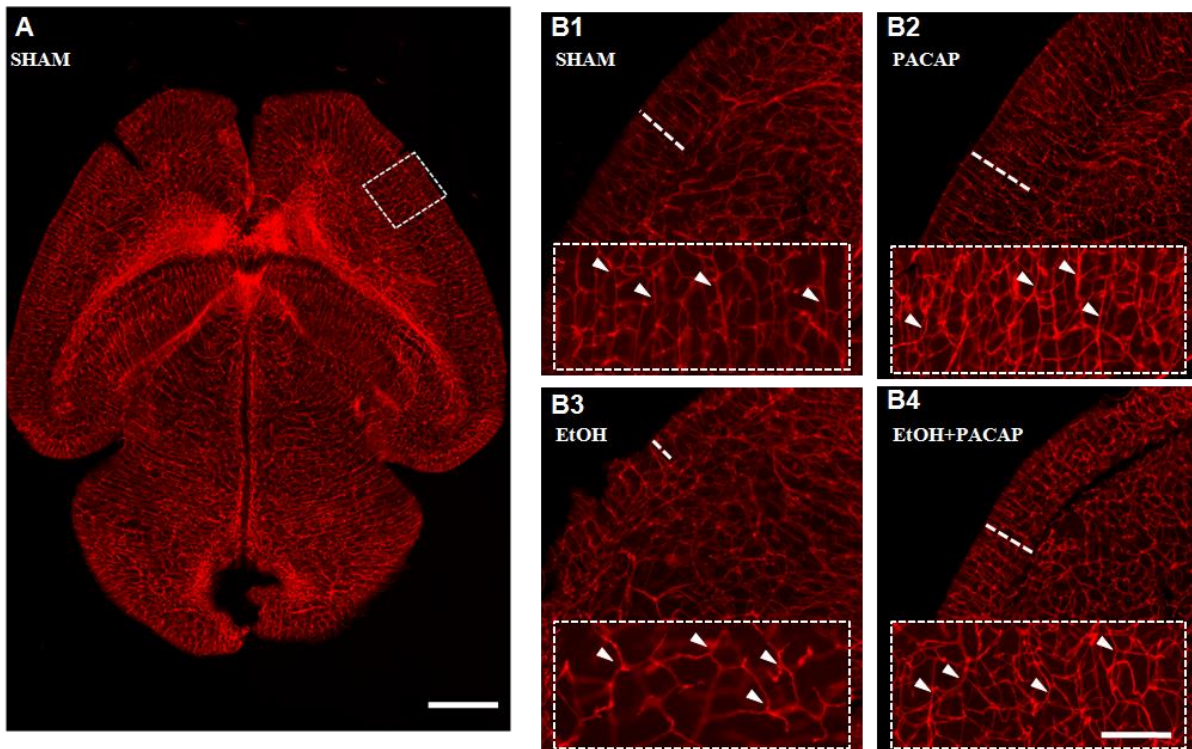


Figure 4

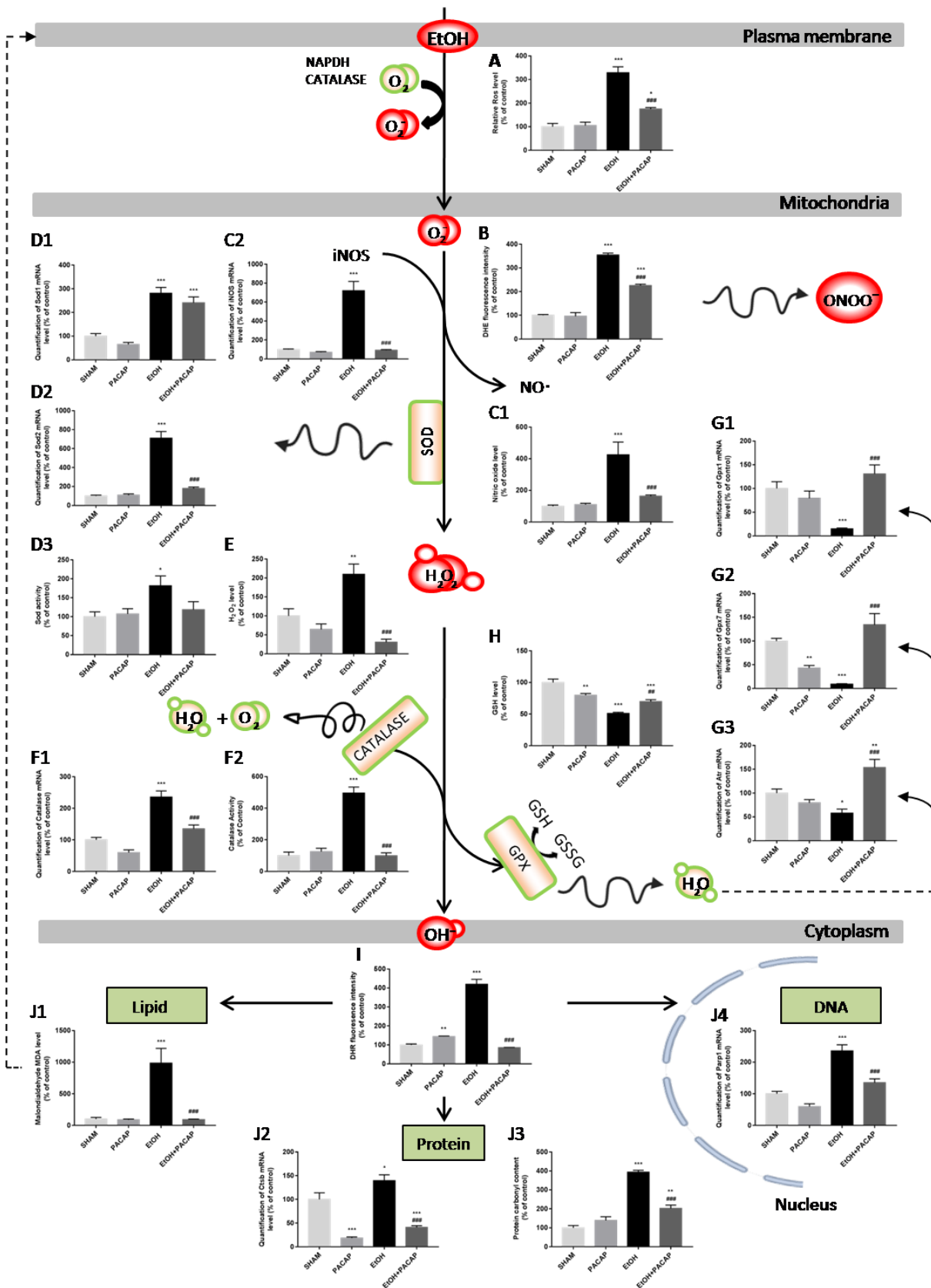


Figure 5

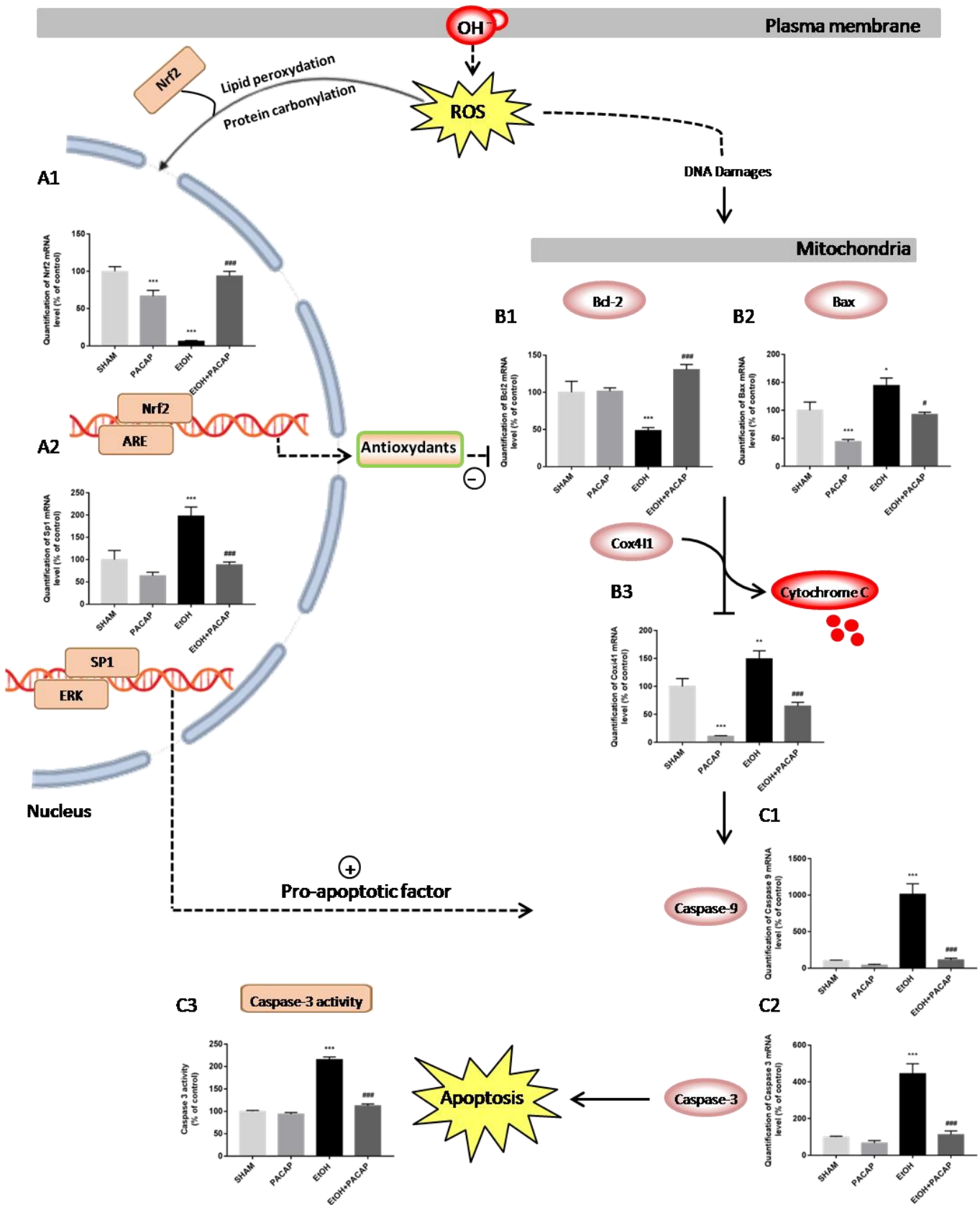


Figure 6

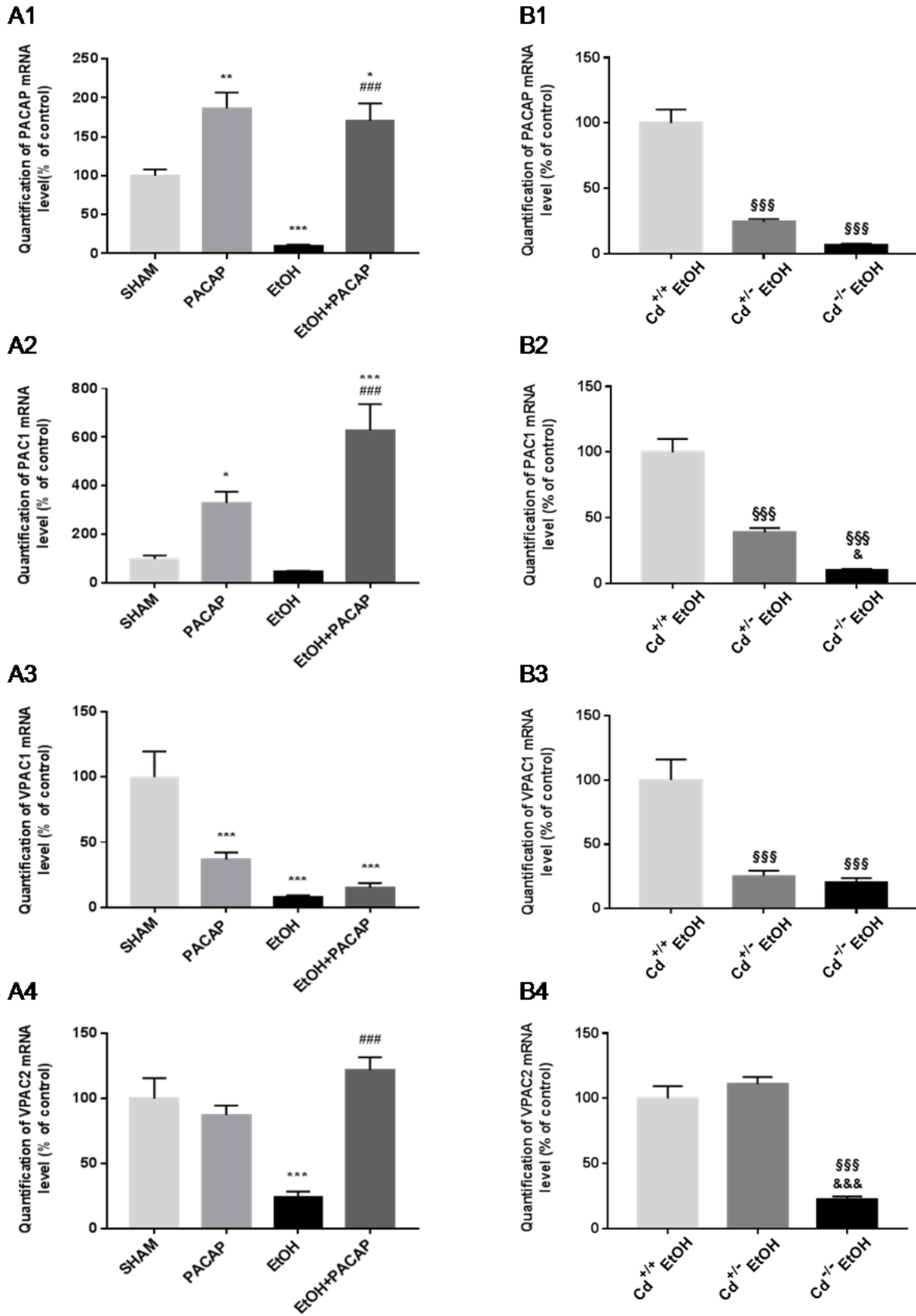
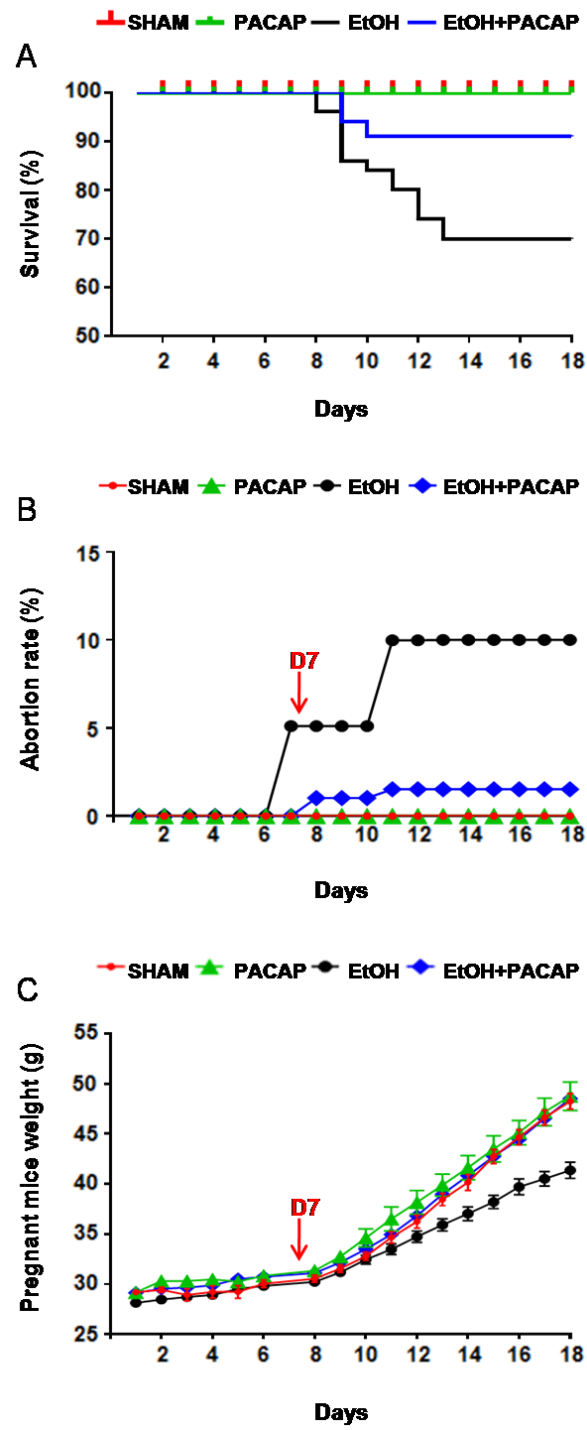
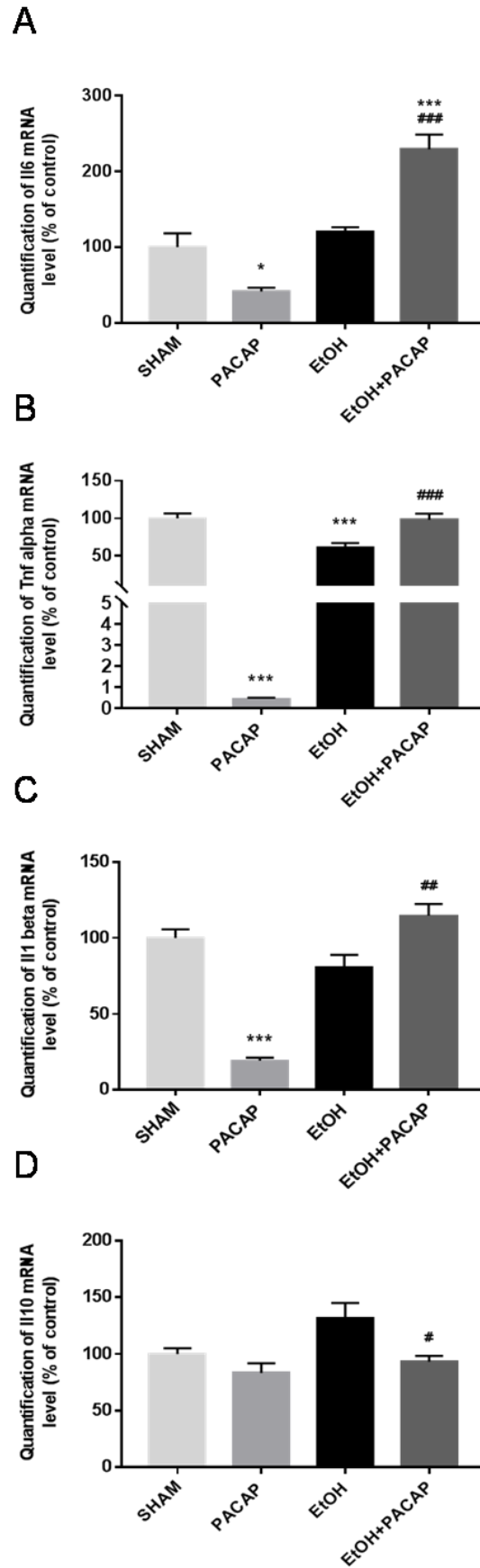


Figure 7



Sup. Figure 1

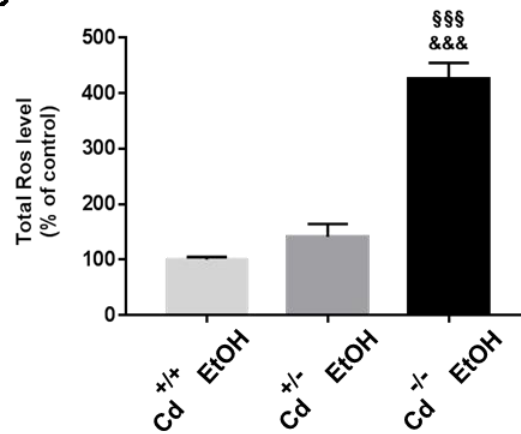


Sup. Figure 2

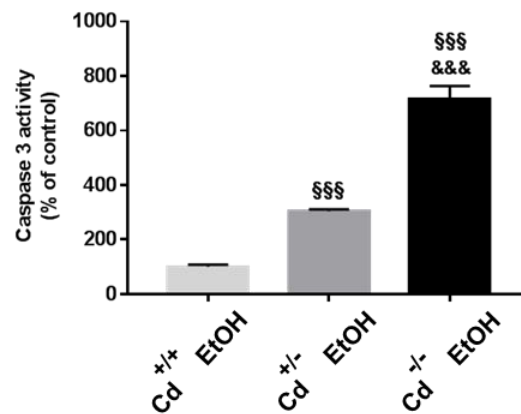
A

Gene symbol	% Ctrl Cd +/-	SEM Cd +/-	% Ctrl Cd -/- (KO)	SEM Cd -/- (KO)	P value
iNos	102 ± 0,14	13,33	138 ± 0,32	15,24	0,095
Sod1	230 ± 1,89	36,45	675 ± 0,1	98,72	0,0001
Sod2	104 ± 0,57	10,35	968 ± 1	145,6	0,0321
Catalase	217 ± 0,54	25,72	272 ± 0,29	30,47	0,74
Gpx1	214 ± 0,86	26,71	930 ± 0,8	71,04	0,025
Gpx7	15 ± 0,55	22,94	16 ± 0,5	23,24	0,0331
Atr	147 ± 0,18	9,18	128 ± 0,13	14,53	0,1
Ctsb	208 ± 0,7	29,19	156 ± 0,47	11,76	0,018
Parp1	67 ± 1,5	3,76	159 ± 0,61	17,31	0,16
TNFα	208 ± 0,7	29,19	156 ± 0,47	11,76	0,003
IL6	84 ± 0,8	5,78	71 ± 0,56	2,054	0,2
IL1β	238 ± 0,17	16,77	160 ± 3,07	25,76	0,42
IL10	420 ± 6	86,32	329 ± 0,43	52,57	0,031
Cox4i1	470 ± 0,5	40,21	390 ± 1,27	26,65	0,111
Bax	295 ± 0,31	31	373 ± 0,1	35,52	0,47
Bcl2	22 ± 1	38,37	13 ± 0,3	16,65	0,0038
Casp9	119 ± 0,39	11,92	390 ± 0,5	19,34	0,47
Casp3	236 ± 0,8	38,08	445 ± 0,19	76,55	0,0003

B

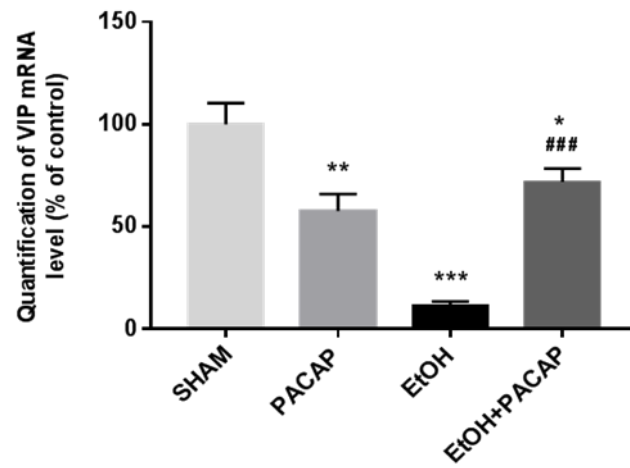


C

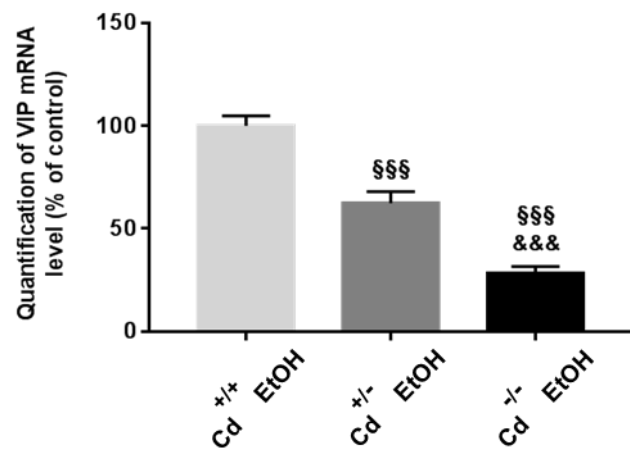


Sup. Figure 3

A



B



Sup. Figure 4

Table 1: Experimental design of the study showing treatments and assays

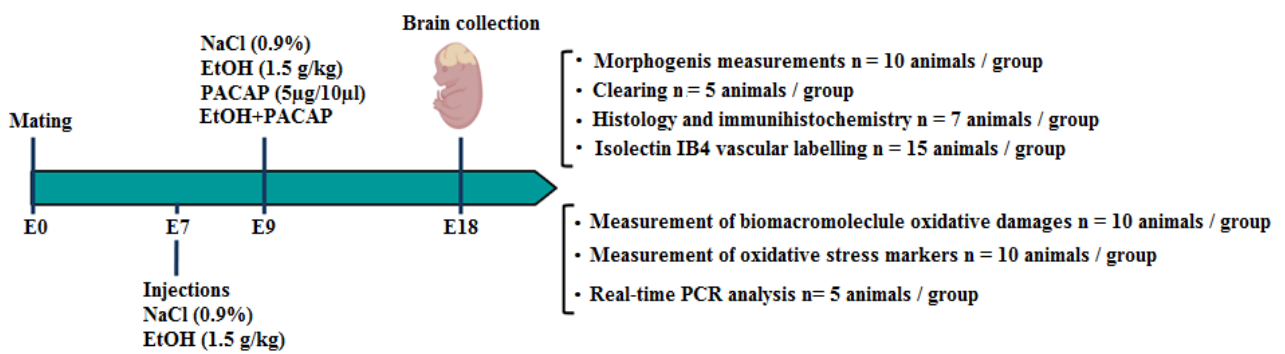


Table 1

Table 2: Sequences of the primers used for the real-time PCR experiments

Gene name	Symbol	NCBI reference	Forward primer	Reverse primer
Actin beta	Actb	NM_007393.3	AGGTCATCACTATTGGCAACGA	CACAGGATTCCATACCCAAGAAG
Adenylate cyclase activating polypeptide 1	Adcyap1	NM_009625.2	GATGCTTCTCGGGTTGTGAT	GGTCATTGGTGCTAGGAAAGG
Adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1 Ataxia telangiectasia and Rad3 related	Adcyap1r1 Atr	NM_001025372.2 NM_019864.1	GGAGGCAATGAGTCGAGCAT GGAGAGTCACGACTTGCTGA	GGGCCACGCCGTAGAGTAATG ACAATAAGCGCCTGGTGAAC
Beta-2 microglobulin	B2m	NM_009735.3	TGGCTCACACTGAATTCACCCCA	TCTCGATCCCAGTAGACGGTCTTGG
Brain derived neurotrophic	Bdnf	NM_001048139.1	AGTCTCCAGGACAGCAAAGC	TGCAACCCGAAGTATGAAATAACC
Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	Casp3	NM_001284409.1	GAGGCTGACTTCTGTATGCTT	AACCACGACCCGCTCTTT
Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Casp9	NM_001277932.1	TGCAGTCCCTCCTTCTCAG	GCTTTTTCCGGAGGAAGTTAAA
Catalase	Cat	NM_009804.2	GGAGGCGGGAACCCAATA	CAAAGTGTGCCATCTCGTCAGT
Cathepsin B	Ctsb	NM_007798.3	GTGTCTGCTGAAGACTGCTT	GGGATAGCCACCATTACAGC
Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	Cox4i1	NM_009941.2	TGTGCTTCGAGCACATGGGAG	GGCAAGGGGTAGTCACGCCG
Fibroblast growth factor 1	Fgf1	NM_010197.3	AAAGTGCGGGCGAAGTGTATAT	GGTGTCTGCGAGCCGTATAAA
Glial cell line derived neurotrophic factor	Gdnf	NM_001301332.1	TTCGCGCTGACCAAGTACTCAA	AGGAAGCGCTGCCGCTGTTTA
Glutathione peroxidase 1	Gpx1	NM_008160.6	ACACCAGGAGAATGGCAAGAA	AACAATGTAAAATGGGGCTCGAA
Glutathione peroxidase 7	Gpx7	NM_024198.3	GCCTTCAAGTACCTAACCCAGAC	TGCTCTGTAATACGGGGCTT
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	NM_001289726.1	CATGGCCTCCGTGTTCTTA	CCTGCTTACCACCTTCTTGA
Insulin-like growth factor 1	Igf1	NM_001111274.1	TTTGCGGGGCTGAGCTGGTG	GCCATAGCCTGTGGGCTTGTGAAG
Interleukin 1 beta	Il1b	NM_008361.4	GAAGAAGAGCCATCCTCTGT	TGTTTATCTCGGAGCCTGTA
Interleukin 6	Il6	NM_001314054.1	GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTG	TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
Interleukin 10	Il10	NM_010548.2	GATGTTGTGCGTTTGTCTCC	CTTGGCAGTTCTGTCCCG
Nitricoxide synthase 1	Nos1	NM_008712.2	CCTGGAAGGATGGAAGAAACG	CAGGCTGCTTGAGCAAAA
Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	Nrf2 (Nfe2l2)	NM_010902.4	TTTCGACTACGCAAGTGACGG	GAGCGTGGAGGTGGATGATG
Peptidyl prolyl isomerase A	Ppia	NM_008907.1	CCACTGTGCTTTTCGCCGC	TGCAACAGCTCGAAGGAGACGC
Poly (ADP-ribose) polymerase 1	Parp1	NM_007415.2	CTATAGTCTTCTCAGGGGTG	TCTCTGTCAACCACCTTAAT
Specific protein 1	Sp1	NM_013672.2	GCTGCCACCATGAGCGACCAA	CACCCGCCACATTGCCGCTA
Superoxide dismutase 1	Sod1	NM_011434.1	AAGCGGTGAACCAAGTTGTGT	CTGCACTGGTACAGCCTTGTGTA
Superoxide dismutase 2	Sod2	NM_013671.3	GCGCTGGAGCCACACATTA	GGTGGCGTTGAGATTGTTC
Superoxide dismutase 3	Sod3	NM_011435.3	GGGGAGGCAACTCAGAGG	TGGCTGAGGTTCTCTGCAC
Transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	NM_011577.2	TGGAGCAACATGTGGAAGTCT	CAGCAGCCGGTTACCAAG
Tumor necrosis factor	Tnf	NM_001278601.1	CACCGTCAGCCGATTTGC	TGAGTTGGTCCCCCTTCTCC
Vascular endothelial growth factor A	Vegfa	NM_009505.4	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	GGTCCCGAAACCTCGAG
Vascular endothelial growth factor B	Vegfb	NM_011697.3	CAGTCAGCTGGGGGAGATGT	AGAGGATCCTGGGGCTGTCT
Vasoactive intestinal peptide receptor 1	Vipr1	NM_011703.4	GGGGAGACAGACCCTGCT	CCATGACGCAATACTGGAAG
Vasoactive intestinal peptide receptor 2	Vipr2	NM_009511.2	CAGACCAGGAAACATAAGCAAAA	GTAGCCACAGCATCTATGAAATC
Vasoactive intestinal polypeptide	Vip	NM_001313969.1	CAGCAGACTTCTGGGTCAGATT	GCTGATTGTTGGCAATGA

Table 2

Article 2

Effet protecteur du PACAP à long terme dans un modèle murin de syndrome l'alcoolisation fœtale (SAF)

Shili Ilhem, Masmoudi-Kouki Olfa, Vaudry David

(*en préparation*)

La consommation d'alcool pendant la grossesse peut provoquer un syndrome d'alcoolisation fœtal (SAF) qui conduit à des malformations physiques et des troubles mentaux persistants tout au long de la vie. Mais en plus de ces séquelles durables, il apparaît que le cerveau des enfants SAF est aussi plus sensible en cas de nouvelle agression à l'âge adulte. Ceci nous a conduit à rechercher l'effet protecteur à long terme d'administrations de PACAP par voie intra-utérine chez des animaux exposés à l'alcool pendant leur vie embryonnaire.

Notre travail a consisté à :

- * Evaluer la toxicité d'une exposition prénatale à l'âge adulte dans un modèle de SAF,
- * Etudier l'effet protecteur sur des cellules neuronales stressées à l'âge adulte d'un traitement au PACAP pendant la vie embryonnaire chez des souris exposées *in utero* à l'éthanol,
- * Examiner l'activité protectrice d'un traitement au PACAP *in utero* contre les altérations comportementales et cognitives induites chez des animaux adultes par une exposition prénatale à l'éthanol.

Long-term protective effect of PACAP in a fetal alcohol syndrome (FAS) model

Shili Ilhem^{1,2}, Masmoudi-Kouki Olfa¹ and Vaudry David^{2,3}

¹Laboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology & Biomolecules Valorisation, Research Unit LR18ES03, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia

²Inserm U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, University of Rouen, 76128 Mont-Saint-Aignan, France

³Regional Platform for Cell Imaging of Normandie (PRIMACEN), Institute for Biomedical Research and Innovation, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

Abstract

In utero ethanol (EtOH) exposure produces developmental alterations in the brain of the fetus, which can result in lifelong behavioral abnormalities. Fetal alcohol spectrum disorders (FASD) is a term used to describe a range of adverse developmental conditions caused by EtOH exposure during gestation. Children diagnosed with FASD potentially exhibit a host of phenotypes including growth retardation, facial dysmorphism, central nervous system alterations and cognitive deficits. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has been shown to exert neuroprotective activities during development and to prevent ethanol neurotoxicity. Considering the powerful anti-apoptotic and anti-oxidative properties of PACAP, the present study focused on the ability of the peptide to protect at postnatal day 30 the brain from prenatal alcohol toxicity. Results show that intra-uterine PACAP injection could counteract ethanol induced animal motor and cognitive alterations at adulthood in a mice FAS model. Furthermore, PACAP prenatal treatment also reduced ethanol induced oxidative damages to biomolecules (lipid peroxidation and protein carbonylation) as well as ROS levels and promoted cell survival in case of new brain aggression at adulthood. These findings indicate that embryonic PACAP treatment protects against fetal alcohol spectrum disorders and holds promise for FAS children to preserve their brain from secondary assaults at adulthood.

Introduction

Alcohol consumption during pregnancy is known to cause very serious birth defects and neurological abnormalities in infants. The deleterious effects of alcohol during development were first described in 1968 and the symptoms reported as Fetal Alcohol Syndrome (FAS). FAS prevalence is around 1 out of 1000 live births globally and is considered as the most common non-genetic cause of mental deficiency and social maladjustment (Abel, 1998; Morleo et al., 2011; Sampson et al., 1997). FAS, is hence a major public health problem, resulting in cognitive deficits, retarded growth, cranio-facial abnormalities and brain atrophy, and has psychosocial outcomes at adulthood responsible for long-lasting cognitive vulnerability and behavioral impairments (Blackburn et al., 2010; Franklin et al., 2008; Rangmar et al., 2015). Previous studies have shown that the most common deficits observed in people with FAS are lower locomotor skills, learning difficulties due to reduced IQ (Mattson et al., 1998), and altered socio-cognitive interactions (Abkarian, 1992; O'Connor and Paley, 2009; Pei et al., 2011), which often lead to hyperactivity, anxiety (Connor et al., 2006), addictive behaviors (Yates et al., 1998), post-traumatic stress disorder and depression (Hellemans et al., 2010; Hoyme et al., 2016).

Neuronal vulnerability to ethanol coincides with a period of intense synaptogenesis that, in humans, starts during the third trimester of pregnancy. Gestational ethanol exposure has caused several neuronal dysfunctions including reduced proliferation, errors in migration, abnormal cellular differentiation, excessive neuronal cell death, formation of aberrant connections by surviving neurons and alteration in the neuronal versus glial cell ratio (Miller et al., 2006; Mooney and Miller, 2007). Since immature neurons are particularly vulnerable to ethanol, some mechanisms have been suggested to explain ethanol induced neurodegeneration in the developing brain (Brocardo et al., 2011; Crews and Nixon, 2009). These potential mechanisms include interference with neurotrophic factor- and retinoid acid-mediated signaling, induction of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, DNA damage, protein aggregation and mitochondria dysfunction resulting in the production of intracellular reactive oxygen species, increased proinflammatory proteins, disruption of the neurotransmitter system, and inhibition of translational gene regulation (Brocardo et al., 2011). It has been shown that serious damage and neuronal loss during development may continue even when these animals are mature with persistent memory and learning impairments (Brocardo et al., 2017; Jevtovic-Todorovic et al., 2003). Therefore, it is important to identify molecules and factors that could block the damage of chronic oxidative stress induced by prenatal exposure

to alcohol in order to develop effective therapeutic approaches to prevent persistent cognitive deficits.

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a 38-amino-acid neuropeptide that belongs to the secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide (VIP) family (Miyata et al., 1989; Vaudry et al., 2000b). PACAP and its receptors are actively expressed in the central nervous system during ontogeny (Basille et al., 1994; Tatsuno et al., 1994) in close association with neurogenic regions, suggesting a major role of this neuropeptide during brain development (Hu et al., 2001). PACAP has been shown to exert neurotrophic and neuroprotective activities (Vaudry et al., 2009). *In vitro* experiments performed on cultured cerebellar granule cells revealed that PACAP promotes neuronal survival and differentiation (Gonzalez et al., 1997; Villalba et al., 1997). PACAP also exerts neurotrophic activities in cortical (Morio et al., 1996) and hippocampal neurons (Yaka et al., 2003). PACAP is able to inhibit neuronal and glial degeneration induced by oxidative damage (Masmoudi-Kouki et al., 2011; Vaudry et al., 2002a) and prevents ethanol-induced cytotoxicity (Botia et al., 2011), PACAP also enhances neuronal differentiation during brain development (Gonzalez et al., 1997; Ogata et al., 2015), induces synapse plasticity (Jayakar et al., 2014) and stimulates cell proliferation in the neurogenic niche in the adult brain (Mercer et al., 2004). These various properties of PACAP suggest that it may play a possible endogenous neuroprotective role in case of heavy alcohol exposure both at adulthood and during developmental periods. Consistent with this hypothesis, it has been shown that exogenous PACAP administration protects the developing cerebellum against ethanol-induced apoptotic cell death both *in vitro* (Vaudry et al., 2002b) and *in vivo* (Botia et al., 2011). Moreover, cultured cerebellar granule cells from PACAP deficient mice are more sensitive to ethanol and oxidative stress than wild-type (WT) cells (Vaudry et al., 2005). However, these studies have been conducted only at early developmental stage on new born pups and little is known regarding the mechanisms involved in the protective effect of the peptide during brain development.

The aim of the present study was to investigate how PACAP *in utero* administration could protect the mice brain at adulthood against prenatal alcohol toxicity in a FAS mice model. In particular, we analyzed how PACAP treatment could counteract ethanol induced animal behavior modifications, but also its capacity to reduce oxidative stress and to promote cell survival in case of brain aggression.

Material and methods

Animals

Animals used in this study were 10-week-old C57BLJ/6 female mice purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Obrestle, France) and their offspring (used at 4-week-old) were borned in an accredited animal facility (approved C7645104) under controlled environment with a 12-h light/dark cycle at 21°C, a temperature of 21±1°C and a humidity of 70±10%. Animals had free access to food and tap water. Approval for these experiments was obtained from the Medical Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Pasteur Institute of Tunis (approval number: FST/LNFP/Pro 162019v3), and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation after evaluation by the French CENOMEXA Ethical Committee (11863 APAFiS 2016111516454101 v4).

In vivo treatment and experimental design

Pregnant mice were divided into four groups, i.e., control ($n = 10$), ethanol ($n = 10$), PACAP ($n = 10$) and ethanol plus PACAP ($n = 10$). From day 7 of gestation (G7) until parturition, animals of the ethanol and ethanol plus PACAP groups received daily intraperitoneal injections of ethanol solution (1.5 g/ Kg) in 400 µl of 0.9% NaCl. On day G9 ethanol plus PACAP group received intrauterine injections of PACAP (1 µg/10µl). Control animals received saline solution instead of ethanol with or without PACAP. The dams were allowed to deliver their offspring naturally and until weaning the pups remained with their mothers. At postnatal day 30 (P30), mice were subjected to a battery of behavioral tests, and then were deeply anesthetized and killed to collect brains for biochemical experiments. Tissue samples were also used to measure ROS and MDA and carbonyl proteins abundance.

Intrauterine injections

Intrauterine injections of saline or PACAP (solutions (5 µg/10 µl/mouse) were performed by free-hand in the cervix of the mouse with a 10 µl Hamilton micro syringe (Hamilton SYR, 10 µl, 701N) connected to a 3.5 mm needle (0.5 mm inner diameter). The needle is inserted through the skin at an angle of 45° at a distance of 1.5 cm above the vaginal orifice and inserted 4.5 to 5 mm in depth. The free-hand intrauterine injections in immobilized mice lasted approximately 5 s and were verified. Intrauterine injections were supervised by an experienced investigator who frequently controlled the regularity and success of the injections, using yellow Chinese dye, and who observed (after pregnant female killing and

peritoneal cavity sectioning) that the injection was successful diffused in more than 95% of the trials to all fetuses (Table 1).

Preparation of brain tissue extracts for biochemical experiments

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital (Sigma Aldrich, 40 mg/kg body weight *i.p.*). After decapitation, cortex from each animal were dissected, homogenized in 1 ml lysis buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA plus Pierce EDTA free protease inhibitor tablets (Thermo Scientific, Paris, France) and centrifuged (14,000 g, 4°C, 15 min). Protein concentration from each homogenate was measured and homogenate aliquots were stored at -80°C until quantification of oxidative stress markers.

Measurement of oxidative stress markers

Measurement of superoxides production

Superoxydes levels were detected by measuring the fluorescence of ethidium which derived from the oxidation of the non-fluorescent compound DHE. An aliquot of 90 µl of brain tissue extract was incubated with 2 µM DHE at 37°C for 30 min in the dark Ethidium fluorescence (λ excitation = 520 nm and λ emission = 610 nm) was measured with a microplate reader (BioTek FL800TBI).

Measurement of malondialdehyde formation

Malondialdehyde (MDA, i.e, a lipid oxidation product) content was determined using an MDA kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20 µl of brain tissue extract was mixed with a solution containing 1% butyl hydroxyl toluene and 20% TCA, and then centrifuged (1000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was mixed with a solution containing 0.5 M HCl, 120 mM 2-thio-barbituric acid plus 26 mM Tris-HCl (pH 7.5) and heated at 95°C for 60 min. After cooling, the absorbance was measured at 532 nm ELx 800TBI (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Protein carbonyl measurement

Oxidative damages of proteins were evaluated by measuring protein carbonylation levels (Hamdi et al., 2015). Proteins contained in the sample were precipitated by addition of a 20% TCA (v/v) and 10 mM DNPH (w/v) mixture. After centrifugation (11,000 × g, 3 min, 4°C), the pellet was washed three times with an ethanol-ethylacetate solution (v/v) and then

resuspended in 500 μl of 6 M guanidine hydrochloride. The absorbance was measured at 370 nm with a Bio-Rad spectrophotometer and protein carbonylation levels were determined by using an extinction coefficient of $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Cell culture

Cell cultures were prepared from 30 days-old mice, as previously described (Tabernero et al., 1993; Vaudry et al., 1999). Briefly, mice were sacrificed by decapitation and brains were quickly removed, dissected on ice, weighed and placed in ice-cold saline. One hemisphere was mechanically dispersed with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle and then filtered on a nylon 100 μm FalconTM Cell strainer. Cell suspensions were plated at a density of $(2.1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \text{ in } 28.2\text{-cm}^2)$ in costar 24-wells culture plates previously coated with poly-D-lysine (12.5 $\mu\text{g /ml}$, BD Bioscience). For cell culture preparation, brains were collected in DMEM/F12 (3:1v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 25 mM KCl, 1% of antibiotic-antimycotic solution, and 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were then incubated at 37° C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂/ 95% air.

Measurement of cell viability

The number of surviving cultured cells was quantified by measuring FDA fluorescence. Cells freshly extracted from brain were incubated at 37°C with fresh serum-free culture medium in the absence or presence of the test substances. At the end of the experiments, cells were incubated at 37°C in the dark with FDA-AM (12 $\mu\text{g/ml}$; 8 min), rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4), and lysed with a Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Fluorescence intensity was measured with excitation at 485 nm and emission at 538 nm using a fluorescence microplate reader FL800TBI (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Pilot experiments have shown that the fluorescence intensity is proportional to the number of cells (in the range of 75×10^4 to 10^6 cells/ml).

Measurement of antioxidant enzyme activities

SOD activity was assessed using a spectrophotometric assay, which consists in measuring epinephrine autoxidation induced by superoxide anions. Briefly, 20 μl from brain extracts were incubated for 3 min (10 μl from brain extract) with a mixture containing bovine

catalase (0.4 U/L), DL-epinephrine (5 mg/mL), and $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ buffer (62.5 mM, pH 10.2).

The oxidation of epinephrine was measured at 480 nm using a Bio-Rad spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Catalase activity was determined on the basis of the disappearance of H_2O_2 . Samples, prepared as described above, were mixed with 30 mM H_2O_2 in PBS. The decrease in H_2O_2 was followed at a wave length of 240 nm for 3 min at 30 s intervals. Catalase activity was expressed using the extinction coefficient of 40/mM/cm for H_2O_2 .

Results

1. PACAP prevents the effect of ethanol body weight loss and cellular oxidative damage on offspring

Prenatal alcohol exposure acutely results in a significant decrease in body weight of offspring compared to the offspring from control animals (24 g vs 21 g, $p < 0.01$) (Fig.2). PACAP administration, which slightly increased body weight, did not counteracted loss induced by ethanol.

Neuronal cells obtained from animals prenatally exposed to ethanol showed a decrease of the proportion of surviving cells ($P < 0.0001$). We next examined whether prenatally exposure to PACAP could prevent ethanol-induced neuronal cell death. While intrauterine injection of PACAP (5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) alone had no effect on cell viability, administration of PACAP to ethanol-treated mice suppressed by 40% ($P < 0.01$) the loss of neuronal neurons induced by the toxin (Fig 1B).

To investigate the effect of *in utero* ethanol and PACAP exposure on oxidative stress at adulthood, superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production was examined (Fig.1C). Control and PACAP exposed offspring had low level of $\text{O}_2^{\cdot-}$ production, compared to ethanol offspring ($\pm 2800\%$, $p < 0.0001$). Cultured cells from offspring animals co-exposed to ethanol and PACAP exhibited superoxide levels similar to control levels. Cultured neuronal cells from offspring exposed to ethanol during pregnancy exhibited a higher level of superoxides than did cells isolated from control animals.

2. PACAP inhibits ethanol induced tissue oxidative damage

Considering the major effect of ROS in the oxidative-generated damage of biomolecules, the ability of PACAP to prevent lipid and protein oxidation induced by prenatal exposure to ethanol was examined at adulthood. *In utero* exposition to ethanol enhanced lipid peroxidation (+40%; $P < 0.001$) (Fig 2A) and protein carbonylation (+28%; $P < 0.05$) (Fig 2B) to ethanol contain high levels of. As illustrated in Fig 2A and 2B, PACAP prevents by itself oxidative damage of biomolecules in offspring brains compared to control group and totally abolished the increase in MDA and carbonyl protein induced by ethanol.

To test whether prenatal exposure to ethanol affects the oxidative stress parameters of postnatal neuronal cells, we assessed the activities of the two antioxidant enzymes, SOD and catalase, considering their major effects on cellular antioxidant defense. Prenatal exposure to ethanol provoked a significant increase of both SOD (+100%, $P < 0.001$) and catalase

(+200%, $P < 0.0001$) activities. In accordance with its antioxidant capacity, PACAP attenuates the effect of ethanol on induction of SOD and catalase activities (Fig. 2C and 2D).

3. Effect of PACAP on behavioral activity of prenatal ethanol exposed offspring.

Elevated Plus-Maze test (EPM)

Anxiety disorders in the elevated plus maze presented significant interaction [$F(3, 16) = 13.97$, $p < 0.0001$] for the percentage of time spent in open arms (Fig. 3A). Control offspring spent more time in open arms (mean = 57 ± 29.5 sec) than ethanol treated animals, which tend to remain confined in the closed arms of the device. In contrast PACAP treatment had no effect on the time spent in the open arm while co-treatment with ethanol + PACAP partially blocked the deleterious effect of ethanol. Data illustrated in (Fig. 3B) show the percentage of open arm entries [$F(3, 16) = 7.026$, $P = 0.0031$] parameters.

This was due to a decrease also in open arm entries to ethanol group and presents statistically significant differences regarding to PACAP and co-treated offspring, both in time in the open arms and open arm visits which are similar to the control group (mean = 50 ± 12.39), suggesting that PACAP may reduce the anxiety state of mice treated with ethanol *in utero*.

Light / Dark Box test (LDB)

Ethanol treated mice exhibited a decrease of the percentage of time spent in the light compartment (Fig. 3C) compared to the control group [$F(3, 16) = 5850$, $p < 0.0001$]. Animal latency into the light compartment was significantly shorter for ethanol group (mean = 17.80 ± 0.4 sec) compared to the PACAP (mean = 39.60 ± 0.4 sec) and the co-treated (mean = 56 ± 0.4 sec) groups. However, a significant difference was detected in the percentage of transition number (Fig. 3D) to the light box [$F(3, 16) = 272$, $p < 0.0001$]. Indeed, PACAP treated mice made more transitions in the system with (40% of frequency (mean = 75 ± 19.27)). Ethanol+PACAP group made (24 % of frequency to the light side), whereas ethanol mice made significantly a less transitions in the light box, suggesting that PACAP could increase the locomotor activity unlike to ethanol offspring were, displayed the lowest percentage of activity level on this assessment.

Hole-Board test

To evaluate anxiety behavioral and locomotor deficiency, the percentage of time spent in the center of the assessment (Fig.3E), was higher for ethanol mice than for control mice [$F(3, 16) = 68.43 < 0.0001$], the interaction was significant for the co-treated group (mean = 15 ± 18.1 sec), which explores the hole board, comparing to ethanol group, were unable to reach the four extremity of the platform. Ethanol offspring presents a consistently reduced hole exploration, while its effect on locomotion too, ethanol treated group kept mainly to the *edges* of the board. On the other hand, control mice [$F(3, 16) = 272 < 0.0001$] preferred the center of the board where they moved easier. In addition, there were also a significant difference between the total head dips explored (Fig.3F), PACAP and ethanol+PACAP mice were significantly greater exploratory activity than ethanol mice group comparing to control group during 5 min (mean = 66.25 ± 9). This can explain that PACAP serve as protective model of various behavioral impairment.

Discussion

Prenatal exposure to ethanol has been associated with structural and functional brain deficits which can be related to long term behavioral and biochemical effects that persist into adulthood (Jones and Smith, 1973). PACAP is involved in the regulation of ethanol effects on several neuronal cell types *in vitro* and tissues *in vivo* (Abad and Waschek, 2011; Reglodi et al., 2011, 2012; Seaborn et al., 2011). The current work may show that PACAP counteracts alterations in adult offspring against ethanol exposure *in utero* (Marquez et al., 2009).

Long-term effects of prenatal ethanol exposure on behavioral impairments:

It has been found that exposure of pregnant mice to alcohol would result in long-term neurobehavioral changes apparent in adult mice, showing an overall reduction in the weights of pups prenatally exposed to ethanol compared to controls, and an increase incidence of depressive- and anxiety-like behaviors (Li, 2004; Osborn et al., 1998). In accordance with our previous studies, the Elevated plus maze test (EPM), the Light/Dark test (LDB) and Hole-board (HB), are validated tests for anxiety related behaviors in rodents. Taken together, the data from these three assays indicates that early life ethanol exposure has specific effects on motoric and exploratory capacity and implicate different exposure windows for divergent patterns of anxiety effects (Osborn et al., 1998). Thus, anxiety and stress were potentially exhibited by the offspring prenatally exposed to ethanol, showing a decrease in latency (Cullen et al., 2013; File and Pellow, 1985) spent in the novel, and involved a fear in open area with a reduced exploration. Also, mice with a history of adolescent-onset drinking exhibited a reduced exploration and motor activity (Costall et al., 1989), induced when mice were placed in a two-chambered cage consisting of a light and a dark compartment, showing avoidance of the ethanol offspring and considering that the illuminance of the light compartment appears to be as stressor reflecting a very high level of anxiety. Prenatal ethanol exposure had also a significant effect on total head dips and timing, the ethanol offspring presented a higher immobility in the novel. Although, to our knowledge, few previous study has utilized the hole-board test in prenatal alcohol exposure models (Riley et al., 1979), but human studies of patients diagnosed with FAS have indicated relative deficits in balance and fine motor control compared to non-affected controls (Connor et al., 2006; File and Pellow, 1985). Further demonstrated that anxiolytic agents reducing exploration and motor activity on the HB test. Our experiments in the elevated plus-maze, light–dark box and hole-board test,

consistently confirmed increased anxiety-like behavior results in reduced processing capacities in complex cognitive tasks in general.

Long-term effects of prenatal ethanol exposure on oxidative stress damages leading to apoptosis and cell survival vulnerability:

The study further suggested that *in utero* ethanol exposure was accompanied not only by the occurrence of anxiety- and depressive-like behaviors (Razumkina et al., 2019), but also with increasing its oxidative stress in the developing brain (Dembele et al., 2006). In fact, long-term effects of ethanol exposure on brain development are related to perturbations of the antioxidant defense mechanism and the CNS vulnerability. The study further suggested that *in utero* ethanol exposure was accompanied not only by the occurrence of anxiety- and depressive-like behaviors (Razumkina et al., 2019) but also with increasing its oxidative stress in the developing brain (Chu et al., 2007; Dembele et al., 2006; Ramachandran et al., 2003). In fact, long-term effects of ethanol exposure on brain development are related to perturbations of the antioxidant defense mechanism and the CNS vulnerability. Our results reaffirm that, prenatal exposure to ethanol, contributes to a redox imbalance, in fetal levels of lipid peroxidation in the brain (Dembele et al., 2006); embryos DNA damage (Liu et al., 2009), protein carbonyls (Dembele et al., 2006) and elicits an enhanced activity of catalase (Panchenko et al., 1987) and showed a gradual increase in the antioxidant capacity, especially in superoxide dismutase (SOD) activity from embryonic age, reaching their peak in the neonatal and adulthood period (Dembele et al., 2006; Khan and Black, 2003). These changes in the levels of endogenous antioxidants brain of rodents exposed *in utero* to ethanol, during the period of brain development, disturbs embryogenesis which may explain the adaptive mechanism in CNS to eliminate the excess of free radicals production (Shirpoor et al., 2009). Even, a short period of prenatal exposure to ethanol can produce long-lasting deficits at adulthood, it's affects maternal antioxidant change in redox-oxidative balance and contributes to a direct consequence on fetal brain development toxicity. Moreover, our present findings demonstrate that, exposure to ethanol *in utero* during gestation, is able to induce an increase in the rate of ROS and contribute to a widespread neurodegeneration, a permanent neuronal cell loss associated with both the increase of ROS level such peroxides and apoptosis during adulthood. Ethanol triggers the apoptosis process in the developing brain via its ability to act as an NMDA receptor antagonist and a GABAergic agonist, leading to the activation of caspase-3 (Ikonomidou et al., 2000), an increase in the cell death expression of the apoptotic gene p53 in the CNS of the offspring (Hashimoto et al., 2001), involving the Bax and Bcl-2

family, suggesting a neurodegeneration (Nowoslawski et al., 2005), through the mitochondrial release of apoptotic signals, which explains its diverse effects on the decrease in neuron number and apoptosis observed in ethanol treated offspring.

PACAP counteracts the long-term effects of prenatal ethanol exposure against oxidative damages and behavioral impairments:

PACAP and behavioral impairments

Several studies have shown that PACAP signaling is involved in a variety of conditions such as stress, anxiety, fear, depression and cognitive functions (Miles et al., 2019; Mustafa et al., 2015). The lack of PACAP has been associated to increased anxiety (Hashimoto et al., 2001; Marquez et al., 2009), development of depressive behavior and hyperactivity (Hattori et al., 2012). PACAP deficiency also promotes addictive behaviors (Mai et al., 2018; Miles et al., 2018; Reglodi et al., 2018), such as alcohol dependency (Tanaka et al., 2010). Based on our observations, PACAP or co-treated PACAP offspring counteracts the anxiolytic effect in the EPM, and decrease the anxiety in HB and LDB tests. In fact, behavioral experiments with PACAP, demonstrate that disruption of PACAP gene in mice lead to perturbations in psychomotor behaviors, implicating PACAP in psychotic brain functions (Hashimoto et al., 2001) and suggesting its role to play a regulation of psychomotor and emotional behaviors (Otto et al., 2001). Several studies confirm that PACAP treatment reduces many behavioral abnormalities such as perturbations in psychomotor behaviors and anxiety acting *via* mediating the stress response. PACAP gene expression and PAC1 receptor mRNA levels had been showed to be of and its expression has been shown to be influenced by alcohol, with an increase in PACAP gene expression and in PAC1 receptor mRNA levels (Gupta et al., 2018) in the brain and the potential effect of PACAP to prevents from alcohol exposure. In fact, PACAP may reduce the behavioral impairment through its receptor PAC1 which has been implicated in the signaling of the locomotor activity and anxiety-related behavior (Otto et al., 2001), under conditions of prolonged stress (Hashimoto et al., 2001). Also, offspring prenatally exposed to ethanol received PACAPergic innervations implicated in chronic and physiological stress adaptation (Dias and Ressler, 2013; Pinhasov et al., 2011). Otherwise, the cAMP–PKA signal transduction pathway has been implicated in acute as well as chronic responses to ethanol (Diamond and Gordon, 1997) even the administration of higher PACAP doses daily causes an activation of cAMP-dependent (Otto et al., 2001) and can leads to an increase in cAMP synthesis and PAC1-activation, through the increases of brain-derived

neurotrophic factor expression such as BDNF and TrkB receptor which, can lead to decrease a long-lasting anxiogenic behavioral response (Fox et al., 2008) and correlate with ours results, that PACAP or PACAP co-treated offspring groups are more resistant than ethanol offspring groups. These findings highlight the neuroprotective effect of PACAP to prevent depressive-like behaviors in ethanol-exposed offspring that are observed in rodent models with FASD through the cAMP–PKA signal transduction pathway and its receptors PAC1.

PACAP and oxidative stress

The changes in antioxidant enzymes from fetal life to adulthood have not been fully described. However, PACAP exerts a significant antioxidant effect and regulates the response to metabolic stressors such as ethanol and oxidative stress (Reglodi et al., 2004; Vaudry et al., 2009). Our findings show that co-treated PACAP offspring group exhibited a decrease in MDA, proteins oxidation and antioxidant enzyme levels such as superoxide dismutase SOD and catalase CAT. This may be related to the potent protective activity of PACAP against oxidative stress (Masmoudi-Kouki et al., 2011; Vaudry et al., 2002b) generated through prenatal exposure to ethanol. PACAP acts differently to counteract the effects of ethanol exposure *in utero*. First of all, PACAP decreases oxidative damages, by influencing multiple signal transduction pathways through the activation of its receptors and the PKA, PKC, and MAP-kinases signaling pathways, to modulates the mitochondrial integrity (Aubert et al., 2006; Vaudry et al., 2002a), which constitute a primary source of oxidative stress in the cell (Friedman and Nunnari, 2014) because once ROS were generated, many reactive oxygen species were synthesized, such as (O^{2-} and NO , OH^{\bullet}). PACAP abolishes the feedback response between mitochondrial and ROS electron transport chain. PACAP inhibits eNOS expression at a transcriptional level eNOS mRNA responsible for prolonged, high-output production of oxidative stress by ethanol. This antioxidant pathway of PACAP appears to be functional at later developmental ages leading to restored homeostasis levels, though, inhibiting the overproduction of SOD and catalase activities induced by oxidative stress, blockage of DNA fragmentation (Vaudry et al., 2003b), and decrease the protein and MDA levels. In addition, our finding refers that PACAP, enhances neuronal survival and neuronal regeneration in the offspring, exposed prenatally to ethanol.

PACAP and its receptors were detected at early embryonic stages, E9.5 embryo (Shuto et al., 1996), reaching the maximum at early postnatal stage (Tatsuno et al., 1994), particularly in the brain (Zhou et al., 1999), and its presence promote the transition from proliferation to neuronal differentiation, contributes to promotes cells survival starting from

embryonic stem cells (Ohtaki et al., 2006) and controls the balance between the pro- and anti-apoptotic factors (Falluel-Morel et al., 2004). Based on our findings, we found that PACAP inhibits caspase via stimulating CREB phosphorylation, and exhibits a variety of neurotrophic and growth factors. PACAP stimulates the neuronal cell viability in offspring, ameliorates the vulnerability of neuronal cells in offspring treated with ethanol. Consequently, these effects of PACAP influences cell survival under different circumstances both during developing and to maintain this neuroprotection at the adulthood.

The potential link between oxidative stress on anxiety may generate because of different mechanisms.

The effect of ethanol and its primary oxidation products

Ethanol acts not only directly through the excess production of free oxygen radicals ROS but also through its primary metabolic products. Alternatively, ethanol metabolized by enzymes, such catalase enzyme, alcohol dehydrogenase (ADH), cytochrome P450 2E1, present in the brain (Rammal et al., 2010); (Zimatkin et al., 2006) and has been found in human fetal cells (Khalighi et al., 1999), a major ethanol metabolite, which is associated with formation of free radical species, and contribute to the impairment of energy homeostasis. This metabolite reached a higher level in the CNS than in blood concentrations (Kiessling, 1962; Ridge, 1963). The present study reports that offspring exposed *in utero* to ethanol, had a higher level of peroxides than the non-treated offspring, this toxic effects induced by the ADH which is not uniformly expressed in the brain (Enrico and Diana, 2017). More interestingly, the presence of substantial quantities leads to high dependence of brain because of the slowness of this pathway (Rehak and Truitt, 1958), comparing to other organ. Furthermore, during the early adulthood period ADH is still not functioning at its full capacity (Pikkarainen and Rähä, 1967) and therefore, the ability of neonatal pups to detoxify ethanol may be reduced and may similarly increase the long-term risk of developing free radicals oxygen spices leading to neuronal cell death and reduced detoxification abilities during the adulthood.

CNS Vulnerability to ethanol and oxidative stress

Our observations have prompted the idea that anxiety had a direct link with the oxidative stress accumulation and the adaptation of cells to survive. As the brain is considered particularly vulnerable to oxidative damage (Bouayed et al., 2009; Halliwell, 2006; Ng et al., 2008); containing a lower level of antioxidants (Rougemont et al., 2002), and a major target

of ethanol to drive the long-term neurobehavioral and cognitive effects. In fact, high ethanol intake during pregnancy increases the rate of ROS, necessitating anti-oxidative defense mechanisms, the embryo develop its antioxidant defense mechanism, which disturbs embryogenesis by deficits in neurulation, cellular migration and differentiation, and synaptic development and slowly increase the activity of the major antioxidant enzymes, from late fetal life to adulthood (Khan and Black, 2003). Our results showed that, the anxious offspring had a strong accumulation of peroxides, a lower cells survival in anxious mice and an impaired oxidative metabolism, suggesting that oxidative stress play role in anxiety and cognitive defects. Several studies, associate that the increase of oxidative stress in some area in the brain such as, hypothalamus and amygdala can alter the function of fear-related circuits in the brain, suggesting its presence in the cerebral and peripheral systems of anxious mice (Rammal et al., 2008), resulting anxiety. Also, the imbalance of the redox system of cells in the brain such as a direct dysregulation of the mitochondria in the cerebral tissue of mouse fetuses that were *in utero* exposed to ethanol (Xu et al., 2005) the overproduction of the antioxidants enzymes SOD, CAT, MDA and carbonyl proteins, or metabolite deficiency such vitamin E (Desrumaux et al., 2005), increases ROS generation, provoked anxiety-like behavior in mice. Taken these effects, confirms that oxidative damage, exhibited oxidative vulnerability of cells surviving population, which exhibited the ability to adaptation in the redox imbalance and reinitiate to the neurodevelopment and survival pathways.

Epigenetic mechanisms underlying prenatal exposure to ethanol

Clinical reports have provided evidence of a link between modification of the epigenetic programming and ethanol, resulting in a modification of signals in the cellular memory and an increase of the vulnerability of the gene and molecular expression pathways in the developing brain (Laufer et al., 2013). Altered regulation in epigenetic processes (Kleiber et al., 2011, 2014; Laufer et al., 2013), resulting a delay in the acquisition of DNA methylation chromatin remodeling, protein synthesis (Downing et al., 2012), developmental retardation (Chen et al., 2013), gene transgenerational transmission in neural function (Laufer et al., 2013), brain alterations (Laufer et al., 2013), metabolic and cellular reprogramming depletions (Kleiber et al., 2014). Consequently, these alterations have been associated with anxiety, in the offspring exposed to ethanol prenatally (Hellemans et al., 2010).

References

- Abad, C., and Waschek, J.A. (2011). Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1025–1035.
- Abel, E.L. (1998). Why Fetal Alcohol Abuse Syndrome? In *Fetal Alcohol Abuse Syndrome*, (Boston, MA: Springer US), pp. 5–18.
- Abkarian, G.G. (1992). Communication effects of prenatal alcohol exposure. *Journal of Communication Disorders* 25, 221–240.
- Aubert, N., Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Xifro, X., Rodriguez-Alvarez, J., Fisch, C., Jouffrey, S.D., Lebigot, J.-F., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2006). PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *Journal of Neurochemistry* 99, 1237–1250.
- Basille, M., Gonzalez, B.J., Fournier, A., and Vaudry, H. (1994). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Developmental Brain Research* 82, 81–89.
- Blackburn, C., Carpenter, B., and Egerton, J. (2010). Shaping the future for children with foetal alcohol spectrum disorders. *Support for Learning* 25, 139–145.
- Botia, B., Jolivel, V., Burel, D., Le Joncour, V., Roy, V., Naassila, M., Bénard, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Neuroprotective Effects of PACAP Against Ethanol-Induced Toxicity in the Developing Rat Cerebellum. *Neurotox Res* 19, 423–434.
- Bouayed, J., Rammal, H., and Soulimani, R. (2009). Oxidative Stress and Anxiety: Relationship and Cellular Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 63–67.
- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., and Christie, B.R. (2011). The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Research Reviews* 67, 209–225.

- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., Wortman, R., Noonan, A., McGinnis, E., Patten, A.R., and Christie, B.R. (2017). The Effects of Ethanol Exposure During Distinct Periods of Brain Development on Oxidative Stress in the Adult Rat Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 41, 26–37.
- Chen, Y., Ozturk, N.C., and Zhou, F.C. (2013). DNA Methylation Program in Developing Hippocampus and Its Alteration by Alcohol. *PLOS ONE* 8, e60503.
- Chu, J., Tong, M., and de la Monte, S.M. (2007). Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol.* 113, 659–673.
- Connor, P.D., Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., and Barr, H.M. (2006). Effects of prenatal alcohol exposure on fine motor coordination and balance: A study of two adult samples. *Neuropsychologia* 44, 744–751.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., and Tomkins, D.M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 777–785.
- Crews, F.T., and Nixon, K. (2009). Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol and Alcoholism* 44, 115–127.
- Cullen, C.L., Burne, T.H.J., Lavidis, N.A., and Moritz, K.M. (2013). Low dose prenatal ethanol exposure induces anxiety-like behaviour and alters dendritic morphology in the basolateral amygdala of rat offspring. *PLoS ONE* 8, e54924.
- Dembele, K., Yao, X.-H., Chen, L., and Nyomba, B.L.G. (2006). Intrauterine ethanol exposure results in hypothalamic oxidative stress and neuroendocrine alterations in adult rat offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R796-802.
- Desrumaux, C., Risold, P.-Y., Schroeder, H., Deckert, V., Masson, D., Athias, A., Laplanche, H., Le Guern, N., Blache, D., Jiang, X.-C., et al. (2005). Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *The FASEB Journal* 19, 296–297.

- Diamond, I., and Gordon, A.S. (1997). Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77, 1–20.
- Dias, B.G., and Ressler, K.J. (2013). PACAP and the PAC1 Receptor in Post-Traumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacol* 38, 245–246.
- Downing, C., Flink, S., Florez-McClure, M.L., Johnson, T.E., Tabakoff, B., and Kechris, K.J. (2012). Gene Expression Changes in C57BL/6J and DBA/2J Mice Following Prenatal Alcohol Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36, 1519–1529.
- Enrico, P., and Diana, M. (2017). On the Accuracy of In Vivo Ethanol and Acetaldehyde Monitoring, a Key Tile in the Puzzle of Acetaldehyde as a Neuroactive Agent. *Front Behav Neurosci* 11.
- Falluel-Morel, A., Aubert, N., Vaudry, D., Basille, M., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2004). Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 91, 1231–1243.
- File, S.E., and Pellow, S. (1985). The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br J Pharmacol* 86, 729–735.
- Fox, J.H., Hammack, S.E., and Falls, W.A. (2008). Exercise is associated with reduction in the anxiogenic effect of mCPP on acoustic startle. *Behavioral Neuroscience* 122, 943–948.
- Franklin, L., Deitz, J., Jirikowic, T., and Astley, S. (2008). Children With Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Problem Behaviors and Sensory Processing. *American Journal of Occupational Therapy* 62, 265–273.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.
- Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78, 419–430.

- Gupta, A., Gargiulo, A.T., Curtis, G.R., Badve, P.S., Pandey, S., and Barson, J.R. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-27 (PACAP-27) in the Thalamic Paraventricular Nucleus Is Stimulated by Ethanol Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 42, 1650–1660.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97, 1634–1658.
- Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D., Leprince, J., Zarrouk, A., Hammami, M., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., and Masmoudi-Kouki, O. (2015). Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides* 71, 56–65.
- Hashimoto, H., Shintani, N., Tanaka, K., Mori, W., Hirose, M., Matsuda, T., Sakaue, M., Miyazaki, J., Niwa, H., Tashiro, F., et al. (2001). Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13355–13360.
- Hattori, S., Takao, K., Tanda, K., Toyama, K., Shintani, N., Baba, A., Hashimoto, H., and Miyakawa, T. (2012). Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci* 6, 58.
- Hellemans, K.G.C., Sliwowska, J.H., Verma, P., and Weinberg, J. (2010). Prenatal alcohol exposure: Fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, 791–807.
- Hoyme, H.E., Kalberg, W.O., Elliott, A.J., Blankenship, J., Buckley, D., Marais, A.-S., Manning, M.A., Robinson, L.K., Adam, M.P., Abdul-Rahman, O., et al. (2016). Updated Clinical Guidelines for Diagnosing Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Pediatrics* 138, e20154256.
- Hu, Z., Lelievre, V., Rodriguez, W.I., Tam, J., Cheng, J.W., Cohen-Cory, S., and Waschek, J.A. (2001). Embryonic expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor gene in the frog *Xenopus laevis* neural tube. *Journal of Comparative Neurology* 441, 266–275.

- Ikonomidou, C. (2000). Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome. *Science* 287, 1056–1060.
- Jayakar, S., Pugh, P., Dale, Z., Starr, E., Cole, S., and Margiotta, J. (2014). PACAP induces plasticity at autonomic synapses by nAChR-dependent NOS1 activation and AKAP-mediated PKA targeting. *Molecular and Cellular Neuroscience* 63.
- Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R.E., Izumi, Y., Benshoff, N.D., Dikranian, K., Zorumski, C.F., Olney, J.W., and Wozniak, D.F. (2003). Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits. *J. Neurosci.* 23, 876–882.
- Jones, K.L., and Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302, 999–1001.
- Khalighi, M., Brzezinski, M., Chen, H., and Juchau, M. (1999). Inhibition of human prenatal biosynthesis of all-trans-retinoic acid by ethanol, ethanol metabolites, and products of lipid peroxidation reactions. *Biochemical Pharmacology* 57, 811–821.
- Khan, J.Y., and Black, S.M. (2003). Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr. Res.* 54, 77–82.
- Kiessling, K.H. (1962). The effect of acetaldehyde on rat brain mitochondria and its occurrence in brain after alcohol injection. *Exp. Cell Res.* 26, 432–434.
- Kleiber, M.L., Wright, E., and Singh, S.M. (2011). Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: Advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Behavioural Brain Research* 223, 376–387.
- Kleiber, M.L., Diehl, E.J., Laufer, B.I., Mantha, K., Chokroborty-Hoque, A., Alberry, B., and Singh, S.M. (2014). Long-term genomic and epigenomic dysregulation as a consequence of prenatal alcohol exposure: a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Front. Genet.* 5.
- Laufer, B.I., Mantha, K., Kleiber, M.L., Diehl, E.J., Addison, S.M.F., and Singh, S.M. (2013). Long-lasting alterations to DNA methylation and ncRNAs could underlie the effects of fetal alcohol exposure in mice. *Dis Model Mech* 6, 977–992.

- Li, Y. (2004). In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. *Pharmacological Research* 49, 467–473.
- Liu, Y., Balaraman, Y., Wang, G., Nephew, K.P., and Zhou, F.C. (2009). Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics* 4, 500–511.
- Mai, H.N., Chung, Y.H., Shin, E.-J., Sharma, N., Jeong, J.H., Jang, C.-G., Saito, K., Nabeshima, T., Reglodi, D., and Kim, H.-C. (2018). IL-6 knockout mice are protected from cocaine-induced kindling behaviors; possible involvement of JAK2/STAT3 and PACAP signalings. *Food and Chemical Toxicology* 116, 249–263.
- Marquez, P., Bebawy, D., Lelièvre, V., Coûté, A.-C., Evans, C.J., Waschek, J.A., and Lutfy, K. (2009). The role of endogenous PACAP in motor stimulation and conditioned place preference induced by morphine in mice. *Psychopharmacology* 204, 457–463.
- Masmoudi-Kouki, O., Douiri, S., Hamdi, Y., Kaddour, H., Bahdoudi, S., Vaudry, D., Basille, M., Leprince, J., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* 117, 403–411.
- Mattson, S.N., Riley, E.P., Gramling, L., Delis, D.C., and Jones, K.L. (1998). Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology* 12, 146–153.
- Mercer, A., Rönnholm, H., Holmberg, J., Lundh, H., Heidrich, J., Zachrisson, O., Ossoinak, A., Frisé, J., and Patrone, C. (2004). PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 76, 205–215.
- Miles, O.W., May, V., and Hammack, S.E. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) Signaling and the Dark Side of Addiction. *J Mol Neurosci.*
- Miles, O.W., May, V., and Hammack, S.E. (2019). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) Signaling and the Dark Side of Addiction. *J Mol Neurosci* 68, 453–464.

- Miller, A.L., Verma, D., Grininger, C., Huang, M.-C., and Goetzl, E.J. (2006). Functional Splice Variants of the Type II G Protein–Coupled Receptor (VPAC2) for Vasoactive Intestinal Peptide in Mouse and Human Lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1070, 422–426.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., and Coy, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 567–574.
- Mooney, S., and Miller, M. (2007). Time-specific effects of ethanol exposure on cranial nerve nuclei: Gastrulation and neuronogenesis. *Experimental Neurology* 205, 56–63.
- Morio, H., Tatsuno, I., Hirai, A., Tamura, Y., and Saito, Y. (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res.* 741, 82–88.
- Morleo, M., Woolfall, K., Dedman, D., Mukherjee, R., Bellis, M.A., and Cook, P.A. (2011). Under-reporting of foetal alcohol spectrum disorders: an analysis of hospital episode statistics. *BMC Pediatrics* 11.
- Mustafa, T., Jiang, S.Z., Eiden, A.M., Weihe, E., Thistlethwaite, I., and Eiden, L.E. (2015). Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice. *Stress* 18, 408–418.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., and Bush, A.I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharm.* 11.
- Nowoslawski, L., Klocke, B.J., and Roth, K.A. (2005). Molecular Regulation of Acute Ethanol-Induced Neuron Apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 490–497.
- O’Connor, M.J., and Paley, B. (2009). Psychiatric conditions associated with prenatal alcohol exposure. *Dev Disabil Res Revs* 15, 225–234.
- Ogata, K., Shintani, N., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Higashi, S., Seiriki, K., Momosaki, H., Vaudry, D., Vaudry, H., Galas, L., et al. (2015). PACAP Enhances Axon Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons to a Comparable Extent as BDNF. *PLoS One* 10.

- Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Aizawa, Y., Takaki, A., Hodoyama, K., Yofu, S., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., et al. (2006). Pituitary adenylyate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *PNAS* *103*, 7488–7493.
- Osborn, J.A., Kim, C.K., Steiger, J., and Weinberg, J. (1998). Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *22*, 685–696.
- Otto, C., Martin, M., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Maldonado, R., and Schütz, G. (2001). Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *92*, 78–84.
- Panchenko, L.F., Pirozhkov, S.V., Popova, S.V., and Antonenkov, V.D. (1987). Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia* *43*, 580–581.
- Pei, J., Denys, K., Hughes, J., and Rasmussen, C. (2011). Mental health issues in fetal alcohol spectrum disorder. *Journal of Mental Health* *20*, 473–483.
- Pikkarainen, P.H., and Rähä, N.C.R. (1967). Development of Alcohol Dehydrogenase Activity in the Human Liver. *Pediatr Res* *1*, 165–168.
- Pinhasov, A., Nesher, E., Gross, M., Turgeman, G., Kreinin, A., and Yadid, G. (2011). The Role of the PACAP Signaling System in Depression.
- Ramachandran, V., Watts, L.T., Maffi, S.K., Chen, J., Schenker, S., and Henderson, G. (2003). Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research* *74*, 577–588.
- Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., and Soulimani, R. (2008). Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* *22*, 1156–1159.

- Rammal, H., Bouayed, J., and Soulimani, R. (2010). A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. *European Journal of Pharmacology* 627, 173–176.
- Rangmar, J., Hjern, A., Vinnerljung, B., Stromland, K., Aronson, M., and Fahlke, C. (2015). Psychosocial Outcomes of Fetal Alcohol Syndrome in Adulthood. *PEDIATRICS* 135, e52–e58.
- Razumkina, E.V., Anokhin, P.K., Proskuryakova, T.V., and Shamakina, I.Yu. (2019). Experimental Approaches to the Study of Behavioral Impairments Associated with Prenatal Exposure to Alcohol. *Neurosci Behav Physi* 49, 894–902.
- Reglodi, D., Fábíán, Z., Tamás, A., Lubics, A., Szeberényi, J., Alexy, T., Tóth, K., Márton, Z., Borsiczky, B., Róth, E., et al. (2004). Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul. Pept.* 123, 51–59.
- Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A., and Tamas, A. (2011). Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 17, 962–972.
- Reglodi, D., Kiss, P., Szabadfi, K., Atlasz, T., Gabriel, R., Horvath, G., Szakaly, P., Sandor, B., Lubics, A., Laszlo, E., et al. (2012). PACAP is an endogenous protective factor—insights from PACAP-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* 48, 482–492.
- Reglodi, D., Atlasz, T., Szabo, E., Jungling, A., Tamas, A., Juhasz, T., Fulop, B.D., and Bardosi, A. (2018). PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience* 40, 437–452.
- Rehak, M., and Truitt, J.E. (1958). Anesthesia. 58. Biochemical effects of acetaldehyde and other aldehydes on oxidative phosphorylation. *Q J Stud Alcohol* 19, 399–405.
- Ridge, J.W. (1963). The metabolism of acetaldehyde by the brain in vivo. *Biochem J* 88, 95–100.
- Riley, E.P., Shapiro, N.R., and Lochry, E.A. (1979). Nose-poking and head-dipping behaviors in rats prenatally exposed to alcohol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 11, 513–519.

- Rougemont, M., Do, K.Q., and Castagné, V. (2002). New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 70, 774–783.
- Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., Little, R.E., Clarren, S.K., Dehaene, P., Hanson, J.W., and Graham, J.M. (1997). Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology* 56, 317–326.
- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr. Pharm. Des.* 17, 204–214.
- Shirpoor, A., Salami, S., Khadem-Ansari, M.H., Minassian, S., and Yegiazarian, M. (2009). Protective Effect of Vitamin E Against Ethanol-Induced Hyperhomocysteinemia, DNA Damage, and Atrophy in the Developing Male Rat Brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33, 1181–1186.
- Shuto, Y., Uchida, D., Onda, H., and Arimura, A. (1996). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor mRNA in the mouse brain. *Regulatory Peptides* 67, 79–83.
- Tabernero, L., Verdaguer, N., Coll, M., Fita, I., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Rich, A., and Aymami, J. (1993). Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin. *Biochemistry* 32, 8403–8410.
- Tanaka, K., Kunishige-Yamamoto, A., Hashimoto, H., Shintani, N., Hayata, A., and Baba, A. (2010). Increased ethanol preference and serotonin 1A receptor-dependent attenuation of ethanol-induced hypothermia in PACAP-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391, 773–777.
- Tatsuno, I., Somogyvari-Vigh, A., and Arimura, A. (1994). Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides* 15, 55–60.

- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *PNAS* *96*, 9415–9420.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Pamantung, T.F., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000). PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *921*, 293–299.
- Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., and Gonzalez, B.J. (2002a). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 1451–1460.
- Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 6398–6403.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2003). Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science* *300*, 1532–1534.
- Vaudry, D., Hamelink, C., Damadzic, R., Eskay, R.L., Gonzalez, B., and Eiden, L.E. (2005). Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* *26*, 2518–2524.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., et al. (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev* *61*, 283–357.
- Villalba, M., Bockaert, J., and Journot, L. (1997). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP-38) Protects Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis by Activating the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase) Pathway. *J. Neurosci.* *17*, 83–90.

- Xu, Y., Liu, P., and Li, Y. (2005). Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 73, 83–91.
- Yaka, R., He, D.-Y., Phamluong, K., and Ron, D. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. *J Biol Chem* 278, 9630–9638.
- Yates, W.R., Cadoret, R.J., Troughton, E.P., Stewart, M., and Giunta, T.S. (1998). Effect of Fetal Alcohol Exposure on Adult Symptoms of Nicotine, Alcohol, and Drug Dependence. *Alcoholism Clin Exp Res* 22, 914–920.
- Zhou, X., Rodriguez, W.I., Casillas, R.A., Ma, V., Tam, J., Hu, Z., Lelievre, V., Chao, A., and Waschek, J.A. (1999). Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *Journal of Neuroscience Research* 57, 953–961.
- Zimatkin, S.M., Pronko, S.P., Vasiliou, V., Gonzalez, F.J., and Deitrich, R.A. (2006). Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 30, 1500–1505.

Figure legends

Table 1. Experimental design of the study showing treatments and assays. Pregnant Swiss mice were divided randomly into 4 groups treated from E7 to E18, i.e. a control group treated with saline solution (0.9% NaCl; group 1) and three experimental groups treated respectively with ethanol (1.5 g / kg, group 2) by intraperitoneal injection, PACAP by intra-uterine injection (5 µg; group 3) or ethanol plus PACAP (group 4). Ethanol and PACAP were dissolved in saline solution. Control animals received an equivalent volume of 100 µl saline solution or of ethanol IP and of 10 µl of saline or PACAP IU. Ethanol was diluted in 0.9% saline to avoid burning and injected as a 15% (w/v) solution. PACAP was dissolved in 0.9% saline solution.

Figure 1. Effect of PACAP against ethanol exposure during prenatal period on body weight gain (g), cell viability and peroxide accumulation at adulthood. Effect of prenatal ethanol exposure on body weight. Pregnant mice at gestational day 7 (G7) were treated during pregnancy with ethanol with or without PACAP, administrated through intrauterine route and G9, until birth. Animal weight was measured at adulthood (P30; Fig.1A). Each value represents the mean (\pm SEM) from 5 animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. * $P < 0.05$ vs saline-treated mice; ## $P < 0.01$ vs prenatal ethanol-treated mice were randomly assigned to one of four treatment groups. Control group received saline solution (0.9% NaCl); PACAP group received 5 µg /10 µl of peptide by intra-uterine injection; ethanol group received 1.5 g / kg ethanol by intraperitoneal injection; and ethanol+ PACAP co-treatment group received both ethanol and PACAP, from day 7 of gestation (G) until birth. Animal weight was measured at adulthood (P30; Fig.1A). Cell survival was quantified by measuring FDA fluorescence intensity, and the results were expressed as percentage of the control (Fig.1B). The accumulation of the reactive oxygen species, superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) was quantified by measuring fluorescence of oxidized dihydrorhodamine (DHR) 123, in the brain and results are expressed as percentage of control (Fig.1C).

Figure 2. Effect of PACAP against ethanol exposure during prenatal period on the activity of antioxidant enzymes at adulthood. Pregnant mice at E7 were randomly assigned to one of the four treatment groups. Control group received saline solution (0.9% NaCl); PACAP group received 5 µg /10 µl of peptide by intra-uterine injection; ethanol group received 1.5 g / kg ethanol by intraperitoneal injection; and ethanol+ PACAP co-treatment

group received both ethanol and PACAP, from day 7 of gestation (G) until birth. Effect of prenatal exposure to PACAP and/or ethanol on lipid peroxidation (Fig.2A) and protein oxidation (Fig.2B) at adulthood was quantified by measuring malondialdehyde (MDA) content and protein carbonylation, respectively, in tissue extract from each treatment group. Effect of prenatal exposure to PACAP and/or ethanol on SOD (Fig.2C) and catalase (Fig.2D) activity at adulthood, was determined by measurement of epinephrine autoxydation induced by superoxide anion and H₂O₂ decrease in tissue extract from each treatment group. The results are expressed as a percentage of control after calculating MDA content, protein carbonylation levels and SOD activities in UI/min/mg protein, and catalase activities in mmol/min/mg protein. Each value is the mean (\pm SEM) of at least 5 different wells from three independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test. *** p < 0.001, vs untreated cells (absence of ethanol and PACAP), open bars, ### p < 0.001 versus prenatal ethanol-treated mice.

Figure 3. Effect of PACAP on offspring behavioral activity against prenatal ethanol exposure. Anxiety disorders were measured through elevated plus maze assessment (percentage of time spent; Fig.3A), percentage of entries into the open arms (Fig. 3B), and Light/dark transition test (percentage of time spent in the light compartment; Fig.3C), frequency to light side entry (Fig.3D). Exploration and Locomotion were measured in the Hole-Board test (percentage of time spent; Fig.3E), total head dips explored (Fig.3F). Each value is the mean (\pm SEM) of at least 5 different wells from three independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test. *** p < 0.001, NS, not statistically different vs. untreated cells (absence of ethanol and PACAP), open bars, ### p < 0.001 versus ethanol-treated mice.

Table 1: Experimental design of the study showing treatments and assays

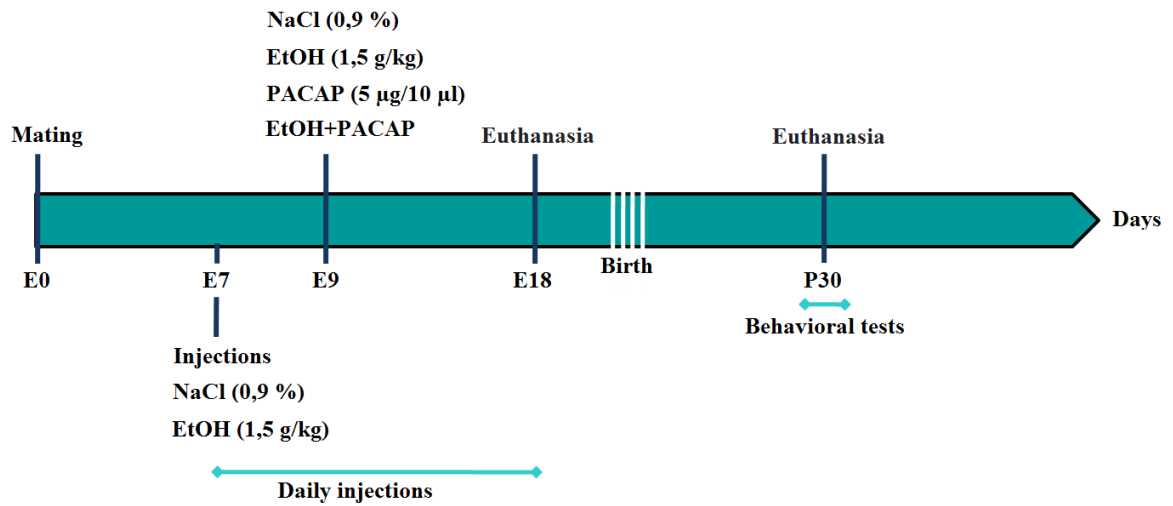


Table 1

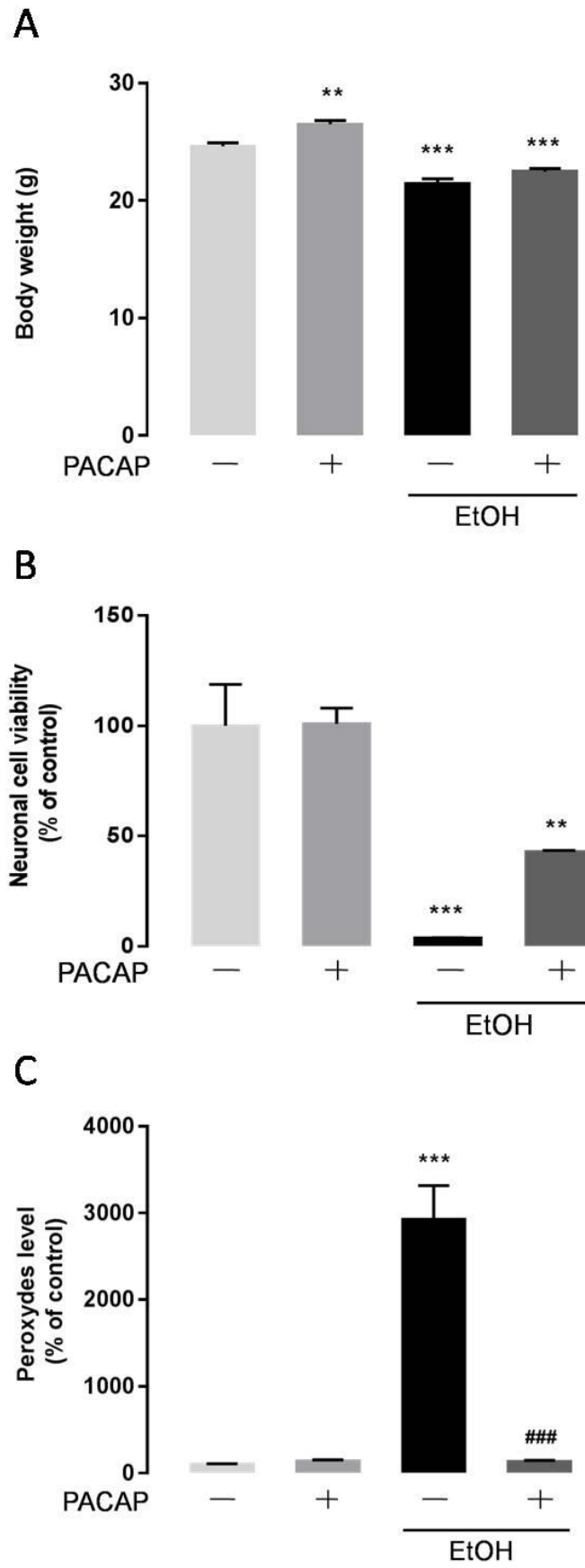


Figure 1

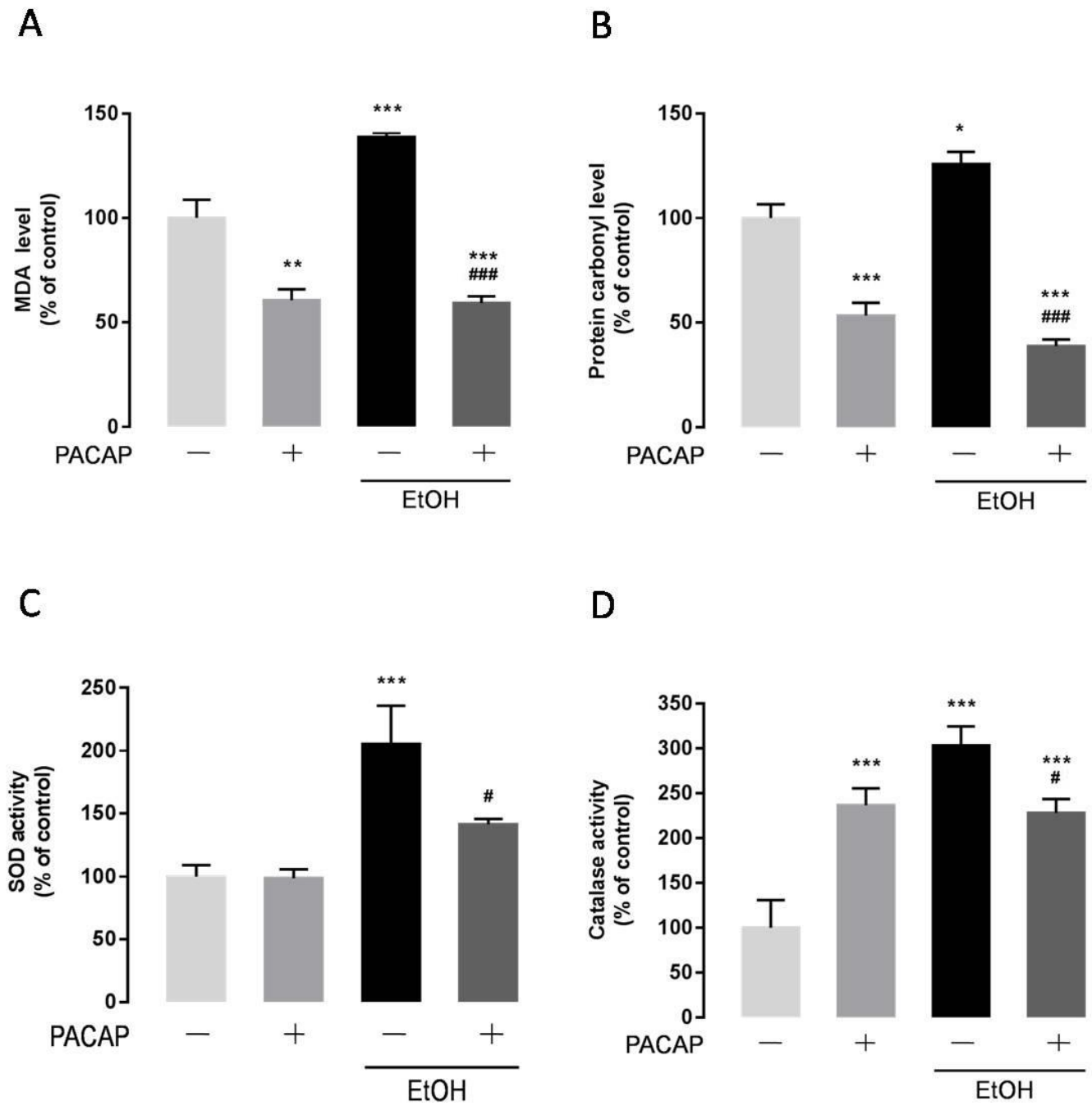


Figure 2

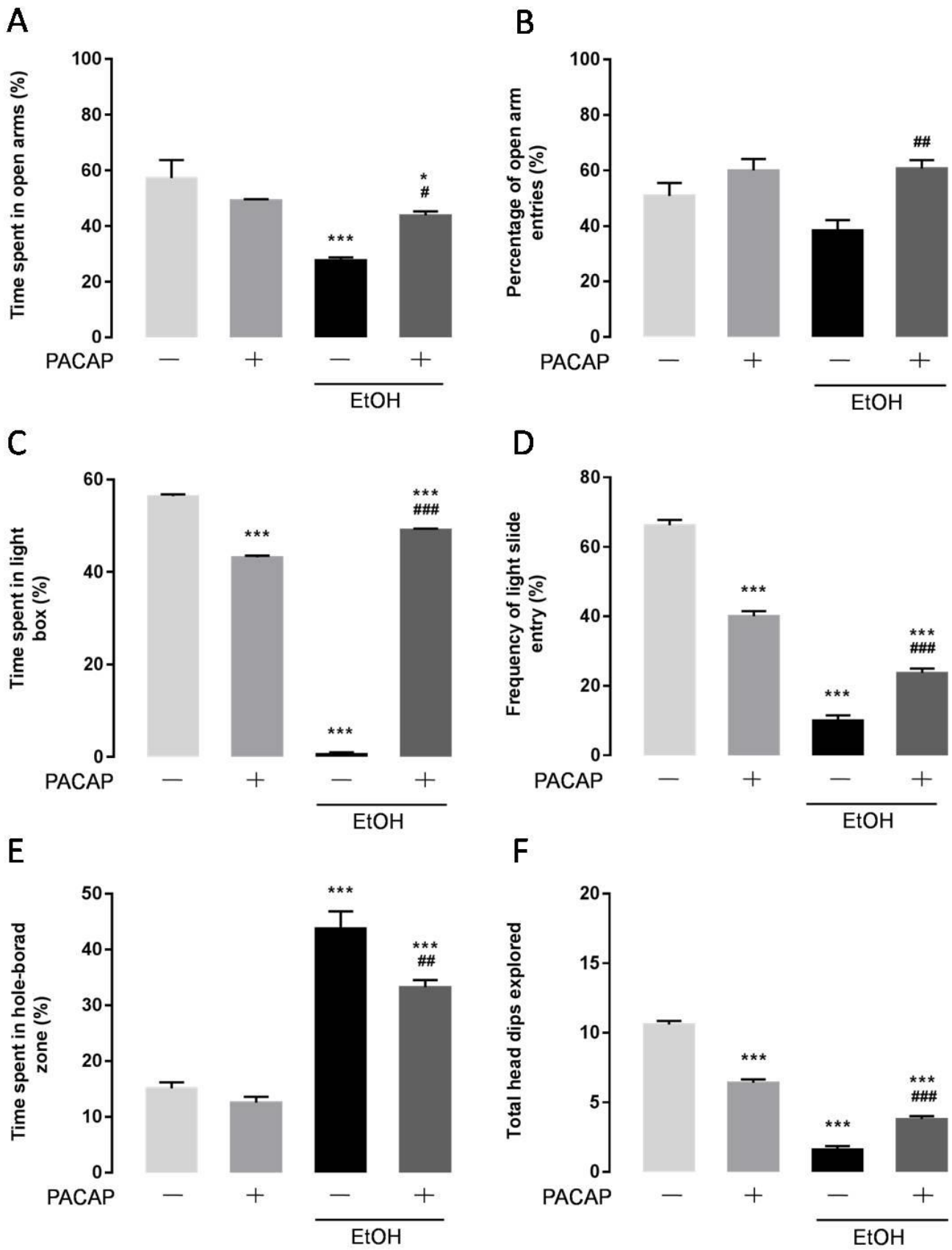


Figure 3

DISCUSSION

Il est connu qu'une exposition prénatale à l'éthanol engendre de graves conséquences dès la vie embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte. L'éthanol est reconnu pour agir comme un agent neurotoxique responsable de diverses complications et malformations regroupées sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF). Les données épidémiologiques considèrent le SAF comme la principale cause de handicap mental non génétique. Les effets tératogènes de l'éthanol peuvent survenir à la suite d'un épisode unique de forte alcoolisation maternelle et pas seulement lors d'une intoxication chronique. Les données statistiques montrent que la gravité du SAF dépend de la quantité d'alcool absorbée, de la période de grossesse, des capacités métaboliques de la mère et de la vulnérabilité individuelle du fœtus. Il a également été montré que la majorité des processus liés au développement embryonnaire est affectée par une exposition prénatale à l'éthanol, mais les mécanismes cellulaires menant au SAF sont encore mal élucidés. De ce fait, l'utilisation de modèles animaux permettant d'étudier les effets de l'alcool au cours du développement sur les cellules neuronales, gliales et endothéliales est nécessaire pour comprendre les mécanismes du SAF chez l'Homme et identifier des biomarqueurs qui permettront de diagnostiquer plus facilement les enfants atteints du SAF. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de SAF développé chez la souris, qui mime des épisodes de *binge drinking* par une injection intrapéritonéale d'éthanol quotidienne à partir de E7 chez la souris, équivalent au premier trimestre de la grossesse chez la femme. Ce mode d'injection présente l'avantage de ne pas être trop stressant pour la souris tout en permettant de contrôler précisément la quantité d'alcool administrée, étant donné que la quantité d'alcool à laquelle est exposé l'embryon à un stade de développement embryonnaire donné corrèle avec les lésions irréversibles du SNC que l'on observe. Avec des administrations d'alcool de E7 à E18, notre modèle cible une large période du développement pendant laquelle l'éthanol peut avoir des effets délétères.

Des études histologiques, réalisées chez la souris, démontrent que l'alcool affecte le développement dès la phase de gastrulation qui débute vers E6,5 ainsi que pendant la neurulation (Sulik, 1984; Wentzel and Eriksson, 2009), et ce en détruisant des cellules de la crête neurale (Cartwright and Smith, 1995; Wentzel and Eriksson, 2009), conduisant à la formation d'un tube neural défectueux (Guerri, 2001). En plus de ses effets neurotoxiques, l'éthanol provoque des modifications épigénétiques qui persistent depuis le développement embryonnaire (2^{ème} trimestre) jusqu'à l'âge adulte (Lee, 2015). Ceci pourrait expliquer qu'une exposition précoce à l'alcool puisse avoir des effets sur des processus de développement tardifs et même sur le fonctionnement du cerveau tout au long de la vie.

La présence de concentrations élevées de PACAP et de ses récepteurs dans les zones germinatives du cerveau au cours de la vie embryonnaire, suggère que ce peptide exerce un effet important dans le développement du cerveau. De fait, il apparaît que le PACAP exerce un effet neurotrophique (Arimura et al., 1994) et qu'il peut aussi, au cours du développement postnatal, protéger les cellules nerveuses vis-à-vis de la toxicité de l'éthanol durant le développement embryonnaire. À partir de E9, nous avons administré du PACAP à des animaux témoins et des souris qui avaient été préalablement soumises à un stress chronique provoqué par des injections d'éthanol. Le PACAP a été administré par voie intra-utérine, afin d'assurer une diffusion directe et rapide du peptide au fœtus en évitant un effet de premier passage dans la circulation sanguine maternelle qui aurait conduit à la dégradation d'une partie importante de la molécule administrée. En effet, le PACAP possède une demi-vie très courte de 2 à 10 minutes (Li et al., 2007; Zhu et al., 2003) et il est rapidement dégradé par des enzymes plasmatiques telles que la DPP-IV, les CP et les endopeptidases. De plus, lorsque le PACAP est hydrolysé par la DPP-IV (Bourgault et al., 2008a, 2008b; Zhu et al., 2003), son produit de dégradation, le PACAP5-38, se comporte comme un antagoniste, réduisant l'activité biologique du peptide. Ce modèle d'administration intra-utérine a permis de mettre en évidence des effets puissants du PACAP exogène sur la répression du système PACAergique induite par l'éthanol, et de façon liée sur une partie des effets délétères de l'alcool dans notre modèle de SAF. Par ailleurs, l'utilisation d'animaux PACAP KO révèle le rôle important que joue le PACAP endogène dans la protection des neurones lorsque le SNC est exposé à une molécule toxique comme l'éthanol.

1. Etude de la capacité du PACAP à protéger contre les effets délétères induits par l'exposition prénatale à l'éthanol chez les fœtus exposés

Le PACAP exerce de nombreux effets protecteurs dans plusieurs modèles expérimentaux *in vitro* (Reglodi et al., 2012; Seaborn et al., 2011; Vaudry et al., 2009) et *in vivo* (Abad and Waschek, 2011; Rat et al., 2011; Reglodi et al., 2011; Shintani et al., 2005; Tamas et al., 2012; Vaudry et al., 2002a) d'atteintes neurodégénératives. Il est aussi établi qu'au cours du développement embryonnaire, le PACAP et ses récepteurs sont abondamment exprimés à partir de E9,5 dans le SNC (Basille et al., 2000b), en particulier au niveau du cortex cérébral et au niveau des ventricules (Suh et al., 2001). De plus, des travaux réalisés pendant la période postnatale montrent que le PACAP protège des effets toxiques de l'éthanol au niveau du cervelet en développement (Botia et al., 2011) et du cerveau dans son ensemble pendant l'adolescence et à l'âge adulte (Lacaille et al., 2017). Ces données nous ont conduit à

rechercher, dans un modèle de SAF murin, la capacité du PACAP à bloquer le retard de croissance et les altérations cérébrales induits par la toxicité de l'éthanol au cours du développement *in utero* (Clode et al., 1987; Padmanabhan and Hameed, 1988). Les résultats montrent que l'administration de PACAP provoque une protection partielle vis-à-vis des lésions morphologiques observées chez ces embryons exposés *in utero* à l'éthanol du stade E7 à E18. En effet, le PACAP corrige partiellement l'atrophie des couches corticales mais par contre, il supprime totalement la désorganisation des microvaisseaux induite par l'éthanol (Jégou et al., 2012) et restaure leur orientation au niveau cortical.

L'étude des mécanismes potentiellement impliqués dans ces effets protecteurs partiels du PACAP montre que le neuropeptide bloque totalement l'effet délétère de l'éthanol sur le stress oxydatif et l'apoptose au niveau cérébral. En effet le PACAP empêche les dégâts oxydatifs de l'éthanol induits par l'accumulation de ROS dans le cerveau des embryons en activant le système antioxydant (SOD, catalase et GPx). Cet effet antioxydant du PACAP semble impliquer le facteur de transcription Nrf2 (Li et al., 2019) et serait un des mécanismes neuroprotecteurs du PACAP. En effet, le PACAP bloque complètement l'expression et l'activation de cascade apoptotique. En revanche, de façon surprenante, le PACAP n'a pas d'effet anti-inflammatoire chez les animaux alcoolisés alors qu'il est connu pour réprimer l'expression des facteurs pro-inflammatoires et stimuler celle des facteurs anti-inflammatoires dans différents modèles pathologiques (Brifault et al., 2015).

En association avec son effet anti-apoptotique, le PACAP restaure l'expression de la plupart des facteurs neurotrophiques qui a été fortement réduite chez les animaux exposés à l'alcool. Il est intéressant de noter que l'action protectrice du PACAP n'est probablement pas seulement liée à son effet trophique sur l'expression du facteur BDNF, compte tenu de son effet propre modeste sur l'expression de cette protéine et de sa capacité à bloquer complètement la chute de l'expression du GDNF observée chez les animaux alcoolisés. Cet effet du PACAP sur l'expression de GDNF chez les animaux alcoolisés pourrait contribuer à une action indirecte du peptide sur le stress oxydatif et la mort apoptotique (Bhave et al., 1999) et peut être même expliquer pourquoi il n'a pas d'effet intrinsèque sur le niveau basal du stress oxydatif ou de la caspase-3.

Les deux facteurs neurotrophiques sur lesquels le PACAP semble avoir moins d'effets chez les animaux alcoolisés sont l'IGF-1 et le BDNF. Ces facteurs sont connus pour jouer un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire (Cheng et al., 2003; DiCicco-Bloom

and Black, 1988) et l'ontogenèse cérébrale (Hodge, 2004), en favorisant la migration des neuroblastes (Hurtado-Chong et al., 2009), la croissance neuritique (Beck et al., 1995) et la survie neuronale (Numakawa et al., 2017). Ainsi, l'altération de l'expression de l'IGF-1 par l'exposition à l'éthanol et l'incapacité du PACAP à restaurer un niveau normal d'IGF-1 pourraient expliquer l'effet protecteur partiel du PACAP contre la perte neuronale induite par l'éthanol. En effet, des études *in vitro* réalisées sur les neurones en grain du cervelet démontrent que la surexpression d'IGF-1 potentialise les effets du PACAP sur la survie neuronale (Maino et al., 2015).

Par contre, la capacité du PACAP à restaurer le niveau d'expression d'autres facteurs de croissance tels que le VEGFa, le VEGFb, le FGF, le TGFβ ou le GDNF, tous capables de stimuler la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales (Bhave et al., 1999; Maharaj et al., 2006; Politi et al., 2001), pourrait expliquer sa capacité à restaurer l'organisation vasculaire. L'IGF-1 est également connu pour stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales, dégrader la matrice extracellulaire et moduler l'expression des molécules d'adhésion (Dallinga et al., 2020). Néanmoins, dans le cas présent, cette hormone ne semble pas exercer d'effet majeur sur l'organisation du réseau vasculaire puisque même si le PACAP n'arrive pas à restaurer son niveau d'expression, le peptide semble bien protéger le réseau vasculaire des effets de l'alcool.

A côté des facteurs neurotrophiques, l'expression du système PACAPergique apparaît fortement altérée chez les animaux exposés à l'alcool. Si le niveau d'expression du PACAP et de ses récepteurs est très réduit, l'expression du VIP est aussi réprimée, montrant qu'il n'y a donc pas de mécanisme de compensation. En revanche, l'administration de PACAP chez les animaux alcoolisés n'a pas le même effet sur tous les acteurs du système PACAPergique. En effet, si cela restaure le niveau d'expression du récepteur VPAC2 et du VIP au niveau de celui retrouvé chez les animaux contrôles, cela entraîne une surexpression du PACAP et de son récepteur PAC1 mais n'a pas d'effet sur le récepteur VPAC1 qui reste 6 fois moins exprimé que chez les animaux contrôles. Ceci peut expliquer l'effet protecteur partiel du PACAP chez les animaux alcoolisés puisqu'il a été montré que la stimulation du récepteur VPAC1 par le VIP[Ala^{11,22,28}] bloque la lésion excitotoxique et inflammatoire induite par une co-administration d'iboténate et d'IL-1β (Favrais et al., 2007), alors que l'activation du récepteur VPAC2 dérégule l'histogenèse corticale chez la souris (Takeuchi et al., 2020). De plus, le mécanisme d'action est probablement complexifié par le fait que le récepteur PAC1 peut se transactiver et ainsi modifier à la fois son activité et celle du récepteur du *gastric inhibitory*

polypeptide (Ke et al., 2020) dont l'expression du ligand est aussi modifiée chez les animaux alcoolisés (Idrovo et al., 2019).

Etant donné que les effets anti-inflammatoires du PACAP impliquent souvent le récepteur VPAC1 (Leceta et al., 2000), sa très forte répression chez les animaux exposés à l'alcool et traités au PACAP pourrait expliquer l'absence d'effet du peptide sur la réponse inflammatoire. A l'inverse, la surexpression du récepteur PAC1, responsable des actions neuroprotectrices du PACAP, chez les animaux exposés à l'alcool et traités au PACAP pourrait expliquer les puissants effets anti-oxydants et anti-apoptotiques observés. Enfin, la surexpression des messagers du PACAP et du VIP chez les animaux exposés à l'alcool pourrait potentialiser l'effet protecteur des injections de PACAP. Un tel effet du PACAP sur l'expression de son messager et du VIP avait déjà été rapporté dans d'autres études menées *in vivo* et *in vitro* (Georg and Fahrenkrug, 2000; Hoshino et al., 1993). L'action du PACAP sur sa propre expression renforce la notion selon laquelle le PACAP endogène exerce un rôle très important dans la protection du cerveau des animaux alcoolisés, comme le montrent les résultats obtenus avec les animaux PACAP KO qui présentent des taux de stress oxydatif fortement accrus et une activité caspase-3 très élevée comparés à ceux des animaux sauvages. Le mécanisme par lequel l'alcool régule les transcrits du système PACAPergique reste à élucider mais cela pourrait passer par l'effet de l'éthanol sur l'expression de facteurs de transcription comme SP1 dont des sites de liaison sont retrouvés dans le promoteur du VPAC2 (Steel and Lutz, 2007), et qui régule l'expression du récepteur PAC1 (Miura et al., 2012). Ce serait le stress oxydatif induit par le métabolisme de l'alcool qui inhiberait l'expression du récepteur PAC1 (Huang et al., 2019).

2. Comment l'éthanol réprime-t-il le système PACAPergique?

Le mécanisme par lequel l'alcool régule les transcrits du système PACAPergique reste à élucider mais comme observé avec l'H₂O₂ dans les neurones en grain du cervelet (Botia et al., 2011), l'induction d'un stress oxydatif insurmontable serait à l'origine de l'inhibition de l'expression du récepteur PAC1 (Huang et al., 2019), *via* la répression de l'expression de facteurs de transcription comme SP1 (Figure 19). En effet, des sites de liaison pour SP1 sont retrouvés au niveau du promoteur des récepteurs VPAC1 (Karacay et al., 2006) et VPAC2 (Steel and Lutz, 2007), et SP1 régule l'expression du récepteur PAC1 (Huang et al., 2019). Il serait maintenant nécessaire de vérifier l'implication de SP1 (Figure 19) en inhibant son activité dans des modèles cellulaires avec de la mithramycine comme cela a été fait pour

étudier le mécanisme impliqué dans la régulation du récepteur de la neurotrophine p75 (Do et al., 2013). Il faudrait aussi déterminer si l'inhibition du système PACAPergique est la conséquence directe de l'exposition à l'éthanol ou si c'est un effet indirect induit par le stress oxydatif que l'on pourrait donc retrouver dans de nombreuses conditions pathologiques.

En dehors de son action sur SP1, l'éthanol régule probablement le système PACAPergique *via* son action sur l'élément de réponse à l'AMPc (CRE)(Asyyed et al., 2006), le *thyroid transcription factor-1*(Kim et al., 2005) ou le *nuclear factor-kappa B* (Rulten et al., 2006) dont on retrouve des sites de liaison sur les promoteurs du PACAP ou de ses récepteurs (Karacay et al., 2006). En revanche, il apparaît que l'éthanol n'affecte pas le facteur de transcription GHF-1 (Emanuele et al., 1992) qui possède pourtant un site de liaison sur le promoteur du PACAP. Ceci indique donc que l'action de l'éthanol sur la régulation de l'expression des messagers codant le PACAP et ses récepteurs passe par des mécanismes spécifiques et ne résulte pas d'une simple dérégulation du niveau d'expression global des facteurs de transcription présents dans les cellules. A l'inverse, certains facteurs de transcription régulés par l'alcool, comme Nrf2, ne semblent pas être impliqués dans la régulation du système PACAPergique, alors que Nrf2 contrecarre les effets délétères de l'éthanol (Wang et al., 2020) et participe aux mécanismes mis en jeu dans les effets neuroprotecteurs du PACAP (Li et al., 2019). De fait, Nrf2 est impliqué dans la régulation du statut redox au niveau cérébral, favorise la croissance neuritique (Yang et al., 2015) et protège les neurones (Kärkkäinen et al., 2014; Wakabayashi et al., 2010; Zhao et al., 2009).

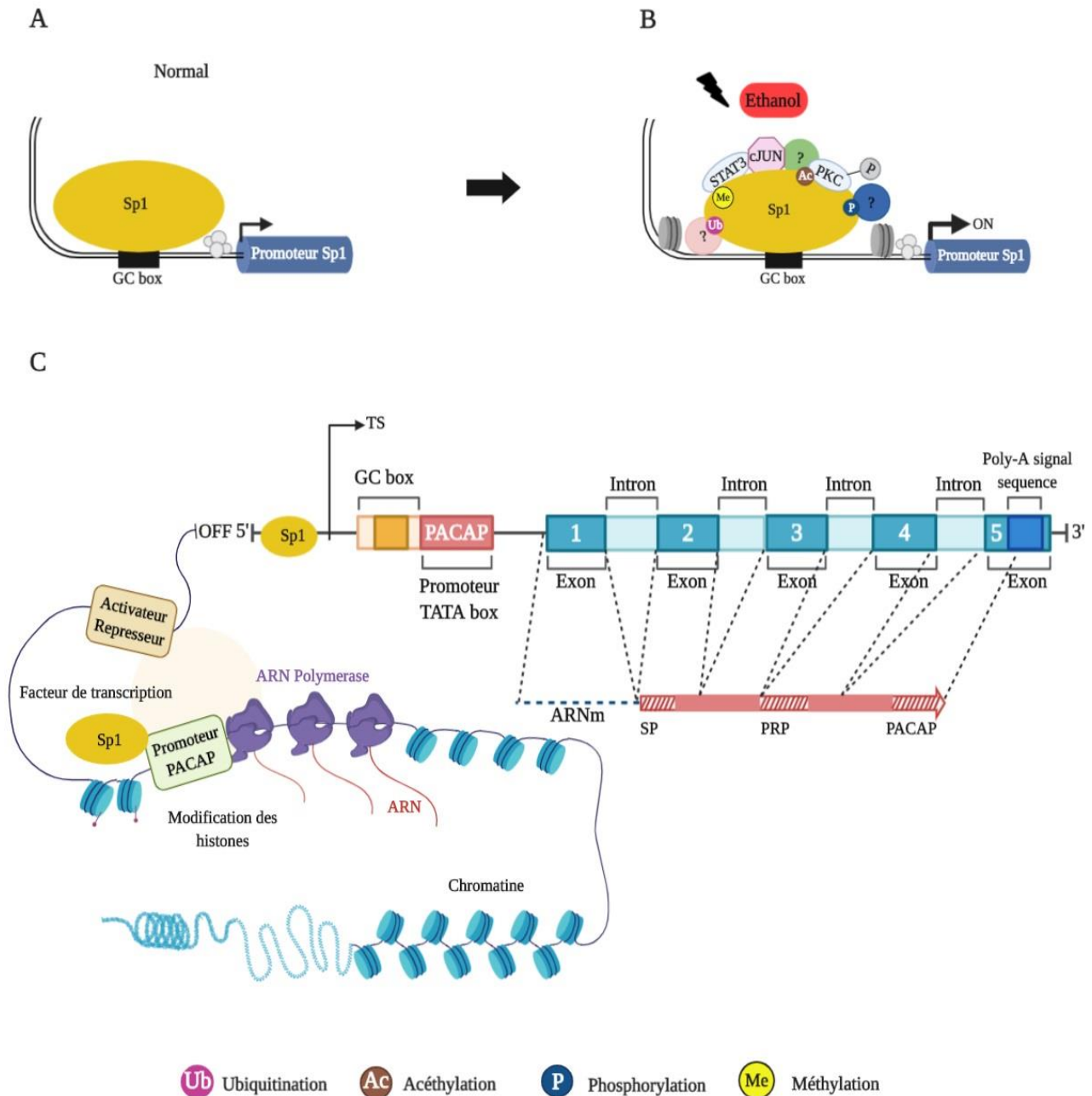


Figure 19 : Schémas récapitulants le mécanisme de délétion du système PACAPergique par l'éthanol via le facteur de transcription Sp1.

A. Promoteur du facteur de transcription Sp1. **B.** Action de l'éthanol sur la transcription du facteur Sp1 et modification épigénétique de la structure du Sp1. **C.** Répression génique du PACAP par la surexpression du Sp1. Les domaines codant pour le peptide signal (Sp), le *PACAP related peptide* (PRP) et le PACAP sont hachurés en rouge. Abréviations : ARN : Acide ribonucléique ; ARNm : Acide ribonucléique messager ; PACAP : Pituitary adenylate cyclase-activating ; PKC : Protéine kinase C ; STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3.

3. Conséquences neurophysiologiques d'une exposition prénatale à l'éthanol à l'âge adulte

Comme le montrent nos résultats, il est clairement admis que le métabolisme de l'éthanol génère au cours de la période néonatale une accumulation de différentes formes de ROS responsable d'un stress oxydatif chronique menant à une mort neuronale (Ramachandran et al., 2001) et à de mauvaises interconnexions des circuits corticaux (El Shawa et al., 2013) perturbant le développement cérébral (Henderson et al., 1999; Zhou et al., 2012). La consommation d'éthanol au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte, provoque aussi des dommages oxydatifs au niveau du cerveau (Mansouri et al., 2001) et altère la neurogenèse (Crews et al., 2006). De plus, il a été démontré que l'exposition à l'alcool pendant la période prénatale a des effets durables à l'âge adulte comme par exemple l'altération des fonctions cognitives (Naninck et al., 2015), un comportement dépressif ou une anxiété exacerbée (Brocardo et al., 2012). Ces effets peuvent être la conséquence des altérations de certaines zones du cerveau provoquées par l'alcool au cours du développement (Gil-Mohapel et al., 2010) et conduisant à une modification de l'expression de neurotransmetteurs comme la dopamine (Druse et al., 1990), mais aussi la conséquence des effets persistants de l'alcool à l'âge adulte sur la neurogenèse (Gil-Mohapel et al., 2010) ou sur le stress oxydatif (Brocardo et al., 2017; Li, 2004). Des études *in vivo* ont démontré qu'une exposition prénatale à l'éthanol, contribue à la formation d'un dysfonctionnement du statut redox chez les animaux, qui se traduit par une accumulation de peroxydes responsables de dommages oxydatifs sur des macromolécules cellulaires et à leur dégradation par oxydation (Dembele et al., 2006), depuis la vie embryonnaire jusqu'à l'âge adulte (Khan and Black, 2003). Il a également été montré que les altérations liées à l'exposition prénatale à l'alcool se perpétuent sur plusieurs générations (Nizhnikov et al., 2016; Ungerer et al., 2013), probablement suite à l'induction de modifications épigénétiques (Leu et al., 2014). Parmi ces modifications, l'acétylation de l'histone au niveau de l'exon1 G9a et la diméthylation de l'histone H3 médiée par la G9a conduit à une neurodégénérescence chez la souris nouveau-née (Subbanna et al., 2014). Ces modifications épigénétiques au cours du développement conduisent à des modifications d'expression de certains gènes à l'âge adulte (Zhang et al., 2015), notamment une altération à long terme des gènes codants pour la SOD et la catalase, ce qui expliquerait la plus grande sensibilité des cellules à un nouveau stress à l'âge adulte. Cette plus grande sensibilité au stress pourrait expliquer que les enfants atteints du SAF possèdent une probabilité accrue de développer des crises épileptiques (Sumner et al., 2013).

L'intervention de micro-ARN est aussi à envisager en raison de l'altération de l'expression de nombreux micro-ARN dans le cerveau de souris soumises à une exposition prénatale à l'éthanol (Kleiber et al., 2014), et pourrait aussi contribuer aux effets néfastes de l'éthanol au cours du développement cérébral puis plus tard à l'âge adulte. En plus des dommages oxydatifs cellulaires provoqués par la surproduction tissulaire de ROS, notre étude montre qu'une exposition prénatale à l'alcool rend le cerveau adulte plus vulnérable aux agressions de son environnement telles que les accidents vasculaires ischémiques (Cananzi and Mayhan, 2019).

Il faut noter que l'action délétère durable de l'alcool peut être réduite en fournissant, pendant la période de gestation, de la vitamine E aux mères alcoolisées (Shirpoor et al., 2009) ou en encourageant les individus après la naissance à faire de l'exercice (Boehme et al., 2011; Brocardo et al., 2012; Klintsova et al., 2012). Nos travaux montrent que l'administration du PACAP pendant la période de gestation bloque certains effets délétères de l'alcool qui peuvent persister à l'âge adulte comme l'accumulation de ROS. Il serait intéressant de vérifier si l'administration de PACAP après la naissance aux animaux exposés *in utero* à l'alcool pourrait enrayer le stress oxydatif persistant.

4. Capacité du PACAP à protéger à l'âge adulte le cerveau de souris exposées à l'éthanol pendant la vie embryonnaire

Il est bien établi que le PACAP et ses récepteurs sont impliqués dans le contrôle des réponses au stress physiologique et dans les déficits du comportement (Hashimoto et al., 2001). Dans notre modèle de SAF, nous avons observé que l'injection de PACAP par voie intra-utérine à partir de E9, prévient la mort des neurones mise en évidence en utilisant une approche par immunofluorescence et imagerie confocale à l'aide d'un anticorps dirigé contre les neurofilaments. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'administration de PACAP permet de compenser la vulnérabilité des cellules neuronales face à la neurotoxicité de l'éthanol. Cela concorde avec les études *in vitro* montrant que le PACAP protège les neurones granulaires du cervelet contre la mort apoptotique induite par l'éthanol (Vaudry et al., 2005).

Les effets neurotoxiques de l'éthanol sont principalement liés à la production de ROS hautement toxiques qui peuvent engendrer des dommages cellulaires irréversibles, atteignant les constituants cellulaires, *i.e.* lipides, protéines et acides nucléiques (Brocardo et al., 2012).

Ainsi, la présente étude montre une augmentation des taux de ROS dans le cerveau de fœtus E18 exposés *in utero* à l'éthanol, associée à une accumulation des produits d'oxydation des lipides et protéines carbonylées. Le PACAP, qui ne présente pas d'activité intrinsèque sur la production de ROS et la formation des produits d'oxydation des biomolécules, supprime totalement les dommages oxydatifs induits par l'éthanol. Cette action neuroprotectrice du PACAP contre les dommages oxydatifs *in vivo*, pourrait être relayée par sa capacité à *i*) stimuler la biosynthèse du GSH à la fois au niveau des astrocytes et des neurones (Douiri et al., 2016; Masmoudi-Kouki et al., 2011) et *ii*) à supprimer les effets du stress oxydatif sur l'accumulation intracellulaire de ROS et l'oxydation des constituants cellulaires en stimulant le système antioxydant endogène (Douiri et al., 2016; Ohtaki et al., 2010).

Il est maintenant clairement établi, grâce aux études épidémiologiques, que les enfants nés de mères alcooliques peuvent développer des déficits du comportement et présenter des troubles pathologiques (Green et al., 2007; Lebel et al., 2011; Lewis et al., 2015). L'étude comportementale, réalisée chez les animaux à P30 révèle que l'exposition *in utero* à l'éthanol réduit fortement les performances des animaux dans le test d'évitement passif où ils passent moins de temps à explorer l'espace éclairée, et que le PACAP bloque partiellement cet effet. Ce test d'évitement passif permet d'évaluer chez l'animal sa capacité exploratrice et par conséquent son niveau d'anxiété. De même, dans le test du labyrinthe en croix surélevé, les animaux adultes exposés pendant la vie prénatale à l'éthanol évitent les espaces ouverts, suggérant un état d'anxiété accru chez ces souris. Le test de la planche à trous indique que l'éthanol entraîne une altération de la coordination motrice et/ou de l'orientation spatiale qui peut être en partie compensée par le traitement au PACAP. De nombreuses études montrent que des administrations de PACAP peuvent compenser les déficits cognitifs (Adamik and Telegdy, 2005; Cabezas-Llobet et al., 2018). A l'inverse, des animaux invalidés pour le gène codant le PACAP ou son récepteur PAC1 présentent une altération de l'orientation spatiale associée à une hyperactivité locomotrice (Hashimoto et al., 2001, 2007; Nicot et al., 2002; Otto et al., 2001; Shintani et al., 2005). Ces données confortent le rôle majeur joué par le système PACAPergique dans la réduction des troubles cognitifs observés chez les souris P30.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse ont mis en évidence l'effet protecteur du PACAP endogène et exogène dans le développement embryonnaire du cerveau vis-à-vis de la toxicité de l'éthanol grâce à un modèle murin de SAF.

La toxicité de l'éthanol et sa forme la plus sévère, à savoir le SAF, représentent un enjeu de santé publique. Pour cela, la découverte d'outils de diagnostic fiables et de nouvelles stratégies thérapeutiques est essentielle. D'un point de vue physiopathologique, les résultats retrouvés suggèrent que le PACAP pourrait être un biomarqueur du SAF. Ce n'est probablement pas un marqueur totalement spécifique puisque des altérations du niveau d'expression du PACAP dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien ou le liquide folliculaire sont retrouvées dans un certain nombre de troubles et de maladies (Bukovics et al., 2014; Koppan et al., 2012). Néanmoins, le niveau de répression observé chez nos animaux alcoolisés est tellement important que le PACAP pourrait être un des candidats biomarqueurs de la neurotoxicité de l'éthanol *in utero*. Des travaux montrent qu'une variation des taux de PACAP dans le liquide amniotique humain est liée à des perturbations physiologiques (Denes et al., 2020). Ceci suggère qu'en cas de suspicion, une amniocentèse pourrait permettre de détecter de façon précoce les sujets atteints du SAF. Néanmoins, des mesures du taux de PACAP au moment de la naissance seraient sûrement moins risquées et plus faciles à mettre en place que ce soit chez le nouveau-né ou au niveau du placenta comme proposé avec le PLFG (Lecuyer et al., 2017).

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que nos injections intra-utérines entraînent un effet trophique notable du PACAP au cours du développement embryonnaire. Parallèlement à cela, nos données indiquent que le PACAP protège partiellement les embryons E18 des lésions morphologiques induites par une exposition *in utero* à l'éthanol. Les études mécanistiques montrent que cette action neuroprotectrice du PACAP n'est pas que la conséquence de son effet trophique pendant la vie embryonnaire, puisque les mécanismes activés par le PACAP dans ces deux cas de figure sont partiellement différents. Par exemple, en conditions normales, le PACAP n'a pas d'effet sur l'expression de GDNF alors que chez les animaux alcoolisés, il restaure totalement le niveau de GDNF qui se trouve fortement réprimé par l'éthanol. Néanmoins, l'interprétation du mécanisme d'action du PACAP chez les animaux alcoolisés est complexifiée par la très forte diminution du niveau d'expression du PACAP et de ses récepteurs en présence d'éthanol.

En effet, notre étude montre qu'une exposition prénatale à l'éthanol réduit très fortement l'expression des gènes du PACAP, du VIP et de leurs récepteurs PAC1, VPAC1 et

VPAC2. Il est à noter que le PACAP bloque cet effet délétère de l'éthanol sur le système PACAPergique, sauf en ce qui concerne l'expression du récepteur VPAC1 qui reste très altérée. Cette répression du système PACAPergique par l'éthanol devrait être étudiée plus en détails afin de déterminer si le PACAP pourrait être un nouveau biomarqueur du SAF. En particulier, il conviendra de déterminer si l'effondrement de l'expression du système PACAPergique s'estompe dès l'arrêt de l'exposition à l'alcool ou si c'est un phénomène durable que résulte d'une reprogrammation épigénétique embryonnaire. En effet, l'éthanol est bien connu pour inhiber différents mécanismes capables de modifier l'expression normale de gènes et la méthylation de l'ADN. Nos données montrant que le niveau d'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'ADN comme *la glutathione peroxidase 7*, *la serine/threonine-protein kinase*, ou PARP-1 est réduite renforcent cette idée. En ce qui concerne le PACAP, son promoteur contient plusieurs sites d'initiation de la transcription et de nombreuses séquences régulatrices dont une boîte GC sur laquelle peut agir le facteur de transcription SP1 dont l'expression est fortement induite par l'éthanol. Ce résultat corrèle avec l'hypothèse que l'éthanol *in utero* en activant l'expression de SP1 au niveau cérébral empêche le remodelage graduel de la chromatine qui se produit pendant le développement et réprime l'expression de certains gènes exerçant une activité neurotrophique ou neuroprotectrice comme le PACAP.

L'étude des effets du PACAP exogène et endogène au niveau moléculaire et cellulaire montre qu'il peut réduire la toxicité de l'éthanol *in utero* chez l'embryon. Le stress oxydatif étant une cause majeure de la toxicité de l'éthanol, nos résultats montrent la grande efficacité du PACAP à s'opposer à l'accumulation cérébrale de ROS et aux dommages oxydatifs des biomolécules *via* la stimulation du système antioxydant endogène enzymatique. De façon intéressante, les travaux menés avec les souris PACAP KO montrent que le PACAP endogène joue aussi un rôle important dans l'activation du système antioxydant et protège ainsi efficacement l'embryon de la toxicité de l'éthanol *in utero*. Cette protection du PACAP pendant la vie embryonnaire apparaît durable puisqu'elle est encore perceptible à l'âge adulte chez les souris P30, exposées *in utero* à l'éthanol, qui présentent moins de déficits comportementaux et dont les cellules sont plus résistantes en cas de nouveau stress. Il sera intéressant de rechercher si une administration de PACAP à la naissance pourrait encore être efficace pour bloquer certains des effets délétères de l'éthanol à long terme dont le stress oxydatif persistant que l'on retrouve dans le cerveau des enfants atteints du SAF.

D'un point de vue clinique, nos résultats permettent d'envisager l'utilisation du PACAP comme agent thérapeutique chez les enfants présentant un SAF. En particulier, l'administration de PACAP par voie intranasale permettrait d'enrayer les niveaux élevés de stress oxydatif qui persistent chez les enfants SAF. Néanmoins, même par cette voie, le PACAP continue à être rapidement dégradé par des enzymes comme la DPP-IV, donc des systèmes de nano-vecteurs à base de polymères permettraient d'encapsuler le peptide afin de le protéger et d'assurer sa libération prolongée dans le cerveau. Nos résultats doivent aussi nous amener à étudier l'utilisation du PACAP comme possible biomarqueur pour identifier les enfants atteints du SAF. Il faudra néanmoins s'assurer que l'effet de l'éthanol sur l'expression du système PACAPergique est durable et trouver une façon peu invasive de mesurer l'effondrement du niveau de PACAP. Finalement, l'ensemble de ces résultats illustrent bien la toxicité de l'éthanol au cours du développement de l'embryon, apportent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les effets délétères de l'alcool *in utero* et laissent entrevoir comment le PACAP pourra être utilisé dans le diagnostic et le traitement des enfants présentant un SAF.

REFERENCES

-A-

- Abad, C., and Waschek, J.A. (2011). Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1025–1035.
- Abel, E.L. (1998). Why Fetal Alcohol Abuse Syndrome? In *Fetal Alcohol Abuse Syndrome*, (Boston, MA: Springer US), pp. 5–18.
- Abkarian, G.G. (1992). Communication effects of prenatal alcohol exposure. *Journal of Communication Disorders* 25, 221–240.
- Adamik, A., and Telegdy, G. (2005). Effects of pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) on extinction of active avoidance learning in rats: involvement of neurotransmitters. *Regulatory Peptides* 127, 55–62.
- Adams, B.A., Gray, S.L., Isaac, E.R., Bianco, A.C., Vidal-Puig, A.J., and Sherwood, N.M. (2008). Feeding and Metabolism in Mice Lacking Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Endocrinology* 149, 1571–1580.
- Adnani, L., Langevin, L.M., Gautier, E., Dixit, R., Parsons, K., Li, S., Kaushik, G., Wilkinson, G., Wilson, R., Childs, S., et al. (2015). *Zac1* Regulates the Differentiation and Migration of Neocortical Neurons via *Pac1*. *J. Neurosci.* 35, 13430–13447.
- Ago, Y., Yoneyama, M., Ishihama, T., Kataoka, S., Kawada, K., Tanaka, T., Ogita, K., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., et al. (2011). Role of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 172, 554–561.
- Allais, A., Burel, D., Isaac, E.R., Gray, S.L., Basille, M., Ravni, A., Sherwood, N.M., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2007). Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2604–2618.
- Alnouti, Y., and Klaassen, C.D. (2008). Tissue Distribution, Ontogeny, and Regulation of Aldehyde Dehydrogenase (Aldh) Enzymes mRNA by Prototypical Microsomal Enzyme Inducers in Mice. *Toxicol Sci* 101, 51–64.

- Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Miyata, A., Mizuno, K., Coy, D.H., and Kitada, C. (1991). Tissue Distribution of PACAP as Determined by RIA: Highly Abundant in the Rat Brain and Testes. *Endocrinology* 129, 2787–2789.
- Arimura, A., Somogyvari-Vigh, A., Weill, C., Fiore, R.C., Tatsuno, I., Bay, V., and Brenneman, D.E. (1994). PACAP functions as a neurotrophic factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 739, 228–243.
- Astley, S.J., and Clarren, S.K. (2001). Measuring the facial phenotype of individuals with prenatal alcohol exposure: correlations with brain dysfunction. *Alcohol Alcohol* 36, 147–159.
- Asyied, A., Storm, D., and Diamond, I. (2006). Ethanol activates cAMP response element-mediated gene expression in select regions of the mouse brain. *Brain Research* 1106, 63–71.
- Attignon, E., Rouach, H., and Blanc, E. (2015). Bases moléculaires des effets toxiques de l'alcool. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 50, 84–93.
- Aubert, N., Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Xifro, X., Rodriguez-Alvarez, J., Fisch, C., Jouffrey, S.D., Lebigot, J.-F., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2006). PACAP and C2-ceramide generate different AP-1 complexes through a MAP-kinase-dependent pathway: involvement of c-Fos in PACAP-induced Bcl-2 expression. *Journal of Neurochemistry* 99, 1237–1250.
- Aubert, N., Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Desfeux, A., Fisch, C., Ancian, P., de Jouffrey, S., Le Bigot, J.-F., Couvineau, A., Laburthe, M., et al. (2008). PACAP prevents toxicity induced by cisplatin in rat and primate neurons but not in proliferating ovary cells: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol. Dis.* 32, 66–80.
- B-**
- Badger, T.M., Ronis, M.J.J., Ingelman-Sundberg, M., and Hakkak, R. (1993). Pulsatile blood alcohol and CYP2E1 induction during chronic alcohol infusions in rats. *Alcohol* 10, 453–457.

- Bake, S., Tingling, J.D., and Miranda, R.C. (2012). Ethanol exposure during pregnancy persistently attenuates cranially directed blood flow in the developing fetus: evidence from ultrasound imaging in a murine second trimester equivalent model. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 36, 748–758.
- Bake, S., Gardner, R., Tingling, J.D., Miranda, R.C., and Sohrabji, F. (2017). Fetal alcohol exposure alters blood flow and neurological responses to transient cerebral ischemia in adult mice. *Alcohol Clin Exp Res* 41, 117–127.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Komaki, G., and Arimura, A. (1993). Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Can Cross the Vascular Component of the Blood-Testis Barrier in the Mouse. *Journal of Andrology* 14, 170–173.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., and Arimura, A. (1998). Effect of Spinal Cord Injury on the Permeability of the Blood–Brain and Blood–Spinal Cord Barriers to the Neurotrophin PACAP. *Experimental Neurology* 151, 116–123.
- Baraona, E., Gentry, R.T., and Lieber, C.S. (1994). Bioavailability of alcohol: role of gastric metabolism and its interaction with other drugs. *Dig Dis* 12, 351–367.
- Baraona, E., Abittan, C.S., Dohmen, K., Moretti, M., Pozzato, G., Chayes, Z.W., Schaefer, C., and Lieber, C.S. (2001). Gender Differences in Pharmacokinetics of Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25, 502–507.
- Barkats, M., Bemelmans, A.P., Geoffroy, M.C., Robert, J.J., Loquet, I., Horellou, P., Revah, F., and Mallet, J. (1996). An adenovirus encoding CuZnSOD protects cultured striatal neurones against glutamate toxicity. *Neuroreport* 7, 497–501.
- Barnes, D.E., and Walker, D.W. (1981). Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Developmental Brain Research* 1, 333–340.
- Basille, M., Gonzalez, B.J., Fournier, A., and Vaudry, H. (1994). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in the rat cerebellum: a quantitative autoradiographic study. *Developmental Brain Research* 82, 81–89.

- Basille, M., Gonzalez, B.J., Desrues, L., Demas, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C activity in rat cerebellar neuroblasts. *J. Neurochem.* *65*, 1318–1324.
- Basille, M., Vaudry, D., Coulouarn, Y., Jégou, S., Lihrmann, I., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2000a). Distribution of PACAP Receptor mRNAs and PACAP Binding Sites in the Rat Brain During Development. *Annals of the New York Academy of Sciences* *921*, 304–307.
- Basille, M., Vaudry, D., Coulouarn, Y., Jégou, S., Lihrmann, I., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B. (2000b). Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *Journal of Comparative Neurology* *425*, 495–509.
- Basille, M., Cartier, D., Vaudry, D., Lihrmann, I., Fournier, A., Fréger, P., Gallo-Payet, N., Vaudry, H., and Gonzalez, B. (2006). Localization and characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the human cerebellum during development. *The Journal of Comparative Neurology* *496*, 468–478.
- Bayer, S.A., and Altman, J. (1990). Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Experimental Neurology* *107*, 48–62.
- Beck, K.D., Powell-Braxton, L., Widmer, H.-R., Valverde, J., and Hefti, F. (1995). *Igf1* gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* *14*, 717–730.
- Becker, H.C., Diaz-Granados, J.L., and Randall, C.L. (1996). Teratogenic actions of ethanol in the mouse: A minireview. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* *55*, 501–513.
- Beebe, X., Darczak, D., Davis-Taber, R.A., Uchic, M.E., Scott, V.E., Jarvis, M.F., and Stewart, A.O. (2008). Discovery and SAR of hydrazide antagonists of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor type 1 (PAC1-R). *Bioorg Med Chem Lett* *18*, 2162–2166.

- Behar, T.N., Scott, C.A., Greene, C.L., Wen, X., Smith, S.V., Maric, D., Liu, Q.-Y., Colton, C.A., and Barker, J.L. (1999). Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration. *J. Neurosci.* *19*, 4449–4461.
- Bell-Parikh, L.C., and Guengerich, F.P. (1999). Kinetics of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *J. Biol. Chem.* *274*, 23833–23840.
- Bhat, A.H., Dar, K.B., Anees, S., Zargar, M.A., Masood, A., Sofi, M.A., and Ganie, S.A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *74*, 101–110.
- Bhave, S.V., and Hoffman, P.L. (2002). Ethanol Promotes Apoptosis in Cerebellar Granule Cells by Inhibiting the Trophic Effect of NMDA. *Journal of Neurochemistry* *68*, 578–586.
- Bhave, S.V., and Hoffman, P.L. (2004). Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J. Neurochem.* *88*, 359–369.
- Bhave, S.V., Ghoda, L., and Hoffman, P.L. (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.
- Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Nême, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* *8*, 1002–1012.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense: *World Allergy Organization Journal* *5*, 9–19.
- Blackburn, C., Carpenter, B., and Egerton, J. (2010). Shaping the future for children with foetal alcohol spectrum disorders. *Support for Learning* *25*, 139–145.
- Blakley, P.M., and Scott, W.J. (1984). Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome: 1. Teratogenicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology* *72*, 355–363.

- Bodnar, T.S., Hill, L.A., and Weinberg, J. (2016). Evidence for an immune signature of prenatal alcohol exposure in female rats. *Brain Behav. Immun.* 58, 130–141.
- Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., and Karin, M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55, 505–518.
- Boehme, F., Gil-Mohapel, J., Cox, A., Patten, A., Giles, E., Brocardo, P.S., and Christie, B.R. (2011). Voluntary exercise induces adult hippocampal neurogenesis and BDNF expression in a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders: Effects of physical exercise in a fetal alcohol syndrome model. *European Journal of Neuroscience* 33, 1799–1811.
- Bonfanti, L., Ponti, G., Luzzati, F., Crociara, P., Parolisi, R., and Armentano, M. (2013). Parenchymal Neuro-Glio-Genesis Versus Germinal Layer- Derived Neurogenesis: Two Faces of Central Nervous System Structural Plasticity. In *Neural Stem Cells - New Perspectives*, L. Bonfanti, ed. (InTech), pp. 242–268.
- Bosron, W.F., and Li, T.K. (1986). Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6, 502–510.
- Botia, B., Basille, M., Allais, A., Raoult, E., Falluel-Morel, A., Galas, L., Jolivel, V., Wurtz, O., Komuro, H., Fournier, A., et al. (2007). Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28, 1746–1752.
- Botia, B., Jolivel, V., Burel, D., Le Joncour, V., Roy, V., Naassila, M., Bénard, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Neuroprotective Effects of PACAP Against Ethanol-Induced Toxicity in the Developing Rat Cerebellum. *Neurotox Res* 19, 423–434.
- Bouayed, J., Rammal, H., and Soulimani, R. (2009). Oxidative Stress and Anxiety: Relationship and Cellular Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 63–67.

- Bourgault, S. (2009). Développement d'agonistes stables du récepteur PAC1 : étude des relations structure-activité du Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. thesis. Rouen.
- Bourgault, A.M., King, M.M., Hart, P., Campbell, M.J.K., Swartz, S., and Lou, M. (2008a). Circle of excellence. Does regular rounding by nursing associates boost patient satisfaction? *Nurs Manage* 39, 18–24.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Botia, B., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., and Fournier, A. (2008b). Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29, 919–932.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., and Fournier, A. (2009a). Molecular and Conformational Determinants of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) for Activation of the PAC1 Receptor. *J. Med. Chem.* 52, 3308–3316.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Dejda, A., Doan, N.D., Vaudry, H., and Fournier, A. (2009b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective Peptide. *Curr. Med. Chem.* 16, 4462–4480.
- Bourgault, S., Chatenet, D., Wurtz, O., Doan, N.D., Leprince, J., Vaudry, H., Fournier, A., and Vaudry, D. (2011). Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1002–1024.
- Brabet, P., Diriong, S., Journot, L., Bockaert, J., and Taviaux, S. (1996). Localization of the Human Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor (PACAP1-R) Gene to 7p15–p14 by Fluorescencein SituHybridization. *Genomics* 38, 100–102.
- Braun, W., Wider, G., Lee, K.H., and Wüthrich, K. (1995). Conformation of Glucagon in a Lipid?Water Interphase by ¹H Nuclear Magnetic Resonance. In *NMR in Structural Biology*, (WORLD SCIENTIFIC), pp. 264–291.
- Brenneman, D.E., Hauser, J.M., Spong, C., and Phillips, T.M. (2002). Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides* 36, 271–280.

- Brien, J.F., Loomis, C.W., Tranmer, J., and McGrath, M. (1983). Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 146, 181–186.
- Brifault, C., Gras, M., Liot, D., May, V., Vaudry, D., and Wurtz, O. (2015). Delayed Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide Delivery After Brain Stroke Improves Functional Recovery by Inducing M2 Microglia/Macrophage Polarization. *Stroke* 46, 520–528.
- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., and Christie, B.R. (2011). The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Research Reviews* 67, 209–225.
- Brocardo, P.S., Boehme, F., Patten, A., Cox, A., Gil-Mohapel, J., and Christie, B.R. (2012). Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. *Neuropharmacology* 62, 1607–1618.
- Brocardo, P.S., Gil-Mohapel, J., Wortman, R., Noonan, A., McGinnis, E., Patten, A.R., and Christie, B.R. (2017). The Effects of Ethanol Exposure During Distinct Periods of Brain Development on Oxidative Stress in the Adult Rat Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 41, 26–37.
- Brolese, G., Lunardi, P., Souza, D.F. de, Lopes, F.M., Leite, M.C., and Gonçalves, C.-A. (2015). Pre- and Postnatal Exposure to Moderate Levels of Ethanol Can Have Long-Lasting Effects on Hippocampal Glutamate Uptake in Adolescent Offspring. *PLOS ONE* 10, e0127845.
- Brown, D., Tamas, A., Reglodi, D., and Tizabi, Y. (2014). PACAP protects against inflammatory-mediated toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells: implication for Parkinson’s disease. *Neurotox Res* 26, 230–239.
- Brubel, R., Boronkai, A., Reglodi, D., Racz, B., Nemeth, J., Kiss, P., Lubics, A., Toth, G., Horvath, G., Varga, T., et al. (2010). Changes in the expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the human placenta during pregnancy and its effects on the survival of JAR choriocarcinoma cells. *J. Mol. Neurosci.* 42, 450–458.

- Brünger, A.T., Campbell, R.L., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Karplus, M., Petsko, G.A., and Teeter, M.M. (1987). Solution of a Protein Crystal Structure with a Model Obtained from NMR Interproton Distance Restraints. *Science* 235, 1049–1053.
- Bühler, M., and Mann, K. (2011). Alcohol and the Human Brain: A Systematic Review of Different Neuroimaging Methods. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35, 1771–1793.
- Bukovics, P., Czeiter, E., Amrein, K., Kovacs, N., Pal, J., Tamas, A., Bagoly, T., Helyes, Z., Buki, A., and Reglodi, D. (2014). Changes of PACAP level in cerebrospinal fluid and plasma of patients with severe traumatic brain injury. *Peptides* 60, 18–22.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental Dynamics* 231, 474–488.
- Burton, G.J., and Jauniaux, E. (1995). Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 102, 818–825.
- Busto, R., Prieto, J.C., Bodega, G., Zapatero, J., and Carrero, I. (2000). Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung. *Peptides* 21, 265–269.
- Butterworth, R.F., Kril, J.J., and Harper, C.G. (1993). Thiamine-Dependent Enzyme Changes in the Brains of Alcoholics: Relationship to the Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Alcoholism Clin Exp Res* 17, 1084–1088.
- Byrd, N., and Grabel, L. (2004). Hedgehog Signaling in Murine Vasculogenesis and Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 14, 308–313.

-C-

- Cabezas-Llobet, N., Vidal-Sancho, L., Masana, M., Fournier, A., Alberch, J., Vaudry, D., and Xifró, X. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Enhances Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory Performance in Huntington's Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 8263–8277.

- Cai, C.-Q., Fang, Y.-L., Shu, J.-B., Zhao, L.-S., Zhang, R.-P., Cao, L.-R., Wang, Y.-Z., Zhi, X.-F., Cui, H.-L., Shi, O.-Y., et al. (2019). Association of neural tube defects with maternal alterations and genetic polymorphisms in one-carbon metabolic pathway. *Italian Journal of Pediatrics* 45, 37.
- Caley, D.W., and Maxwell, D.S. (1970). Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology* 138, 31–47.
- Cameron, D.B., Galas, L., Jiang, Y., Raoult, E., Vaudry, D., and Komuro, H. (2007). Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 146, 697–712.
- Cananzi, S.G., and Mayhan, W.G. (2019). In utero exposure to alcohol alters reactivity of cerebral arterioles. *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 332–341.
- Carito, V., Ceccanti, M., Ferraguti, G., Coccorello, R., Ciafrè, S., Tirassa, P., and Fiore, M. (2019). NGF and BDNF Alterations by Prenatal Alcohol Exposure. *Curr Neuropharmacol* 17, 308–317.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Cartwright, M.M., and Smith, S.M. (1995). Increased Cell Death and Reduced Neural Crest Cell Numbers in Ethanol-Exposed Embryos: Partial Basis for the Fetal Alcohol Syndrome Phenotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19, 378–386.
- Castrillo, J.L., Theill, L.E., and Karin, M. (1991). Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253, 197–199.
- Cazillis, M., Gonzalez, B.J., Billardon, C., Lombet, A., Fraichard, A., Samarut, J., Gressens, P., Vaudry, H., and Rostène, W. (2004). VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 19, 798–808.
- Chabenne, A., Moon, C., Ojo, C., Khogali, A., Nepal, B., and Sharma, S. (2014). Biomarkers in fetal alcohol syndrome. *Biomarkers and Genomic Medicine* 6, 12–22.

- Chandorkar, G.A., Ampasavate, C., Stobaugh, J.F., and Audus, K.L. (1999). Peptide transport and metabolism across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 38, 59–67.
- Chanraud, S., Martelli, C., Delain, F., Kostogianni, N., Douaud, G., Aubin, H.-J., Reynaud, M., and Martinot, J.-L. (2007). Brain Morphometry and Cognitive Performance in Detoxified Alcohol-Dependents with Preserved Psychosocial Functioning. *Neuropsychopharmacology* 32, 429–438.
- Chartrel, N., Tonon, M.C., Vaudry, H., and Conlon, J.M. (1991). Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology* 129, 3367–3371.
- Chatterjee, M., Sparvoli, S., Edmunds, C., Garosi, P., Findlay, K., and Martin, C. (1996). DAG, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 15, 4194–4207.
- Chen, W.-H., and Tzeng, S.-F. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cell death in the spinal cord with traumatic injury. *Neurosci. Lett.* 384, 117–121.
- Chen, C.-H., Pan, C.-H., Chen, C.-C., and Huang, M.-C. (2011). Increased oxidative DNA damage in patients with alcohol dependence and its correlation with alcohol withdrawal severity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35, 338–344.
- Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J., and Gillette, M.U. (1999). Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13468–13473.
- Chen, Y., Samal, B., Hamelink, C.R., Xiang, C.C., Chen, Y., Chen, M., Vaudry, D., Brownstein, M.J., Hallenbeck, J.M., and Eiden, L.E. (2006). Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regulatory Peptides* 137, 4–19.
- Chen, Y., Ozturk, N.C., and Zhou, F.C. (2013). DNA Methylation Program in Developing Hippocampus and Its Alteration by Alcohol. *PLOS ONE* 8, e60503.

- Cheng, C.M., Mervis, R.F., Niu, S.-L., Salem, N., Witters, L.A., Tseng, V., Reinhardt, R., and Bondy, C.A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J. Neurosci. Res.* *73*, 1–9.
- Cherait, A., Maucotel, J., Lefranc, B., Leprince, J., and Vaudry, D. (2020). Intranasal administration of PACAP is an efficient delivery route to reduce infarct volume and promote functional recovery after transient and permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). *Front. Endocrinol.* *11*.
- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K., and McCann, P.P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* *10*, 471–480.
- Chu, J., Tong, M., and de la Monte, S.M. (2007). Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol.* *113*, 659–673.
- Chung, C.Y., Seo, H., Sonntag, K.C., Brooks, A., Lin, L., and Isacson, O. (2005). Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1709–1725.
- Clarren, S.K., Alvord, E.C., Sumi, S.M., Streissguth, A.P., and Smith, D.W. (1978). Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *The Journal of Pediatrics* *92*, 64–67.
- Climont, E., Pascual, M., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (2002). Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* *68*, 213–225.
- Clode, A.M., Pratten, M.K., and Beck, F. (1987). The Effect of Ethanol on the Growth of Rat Embryos: The Role of Stage Dependency and Hyperosmolality. In *Mechanisms and Models in Toxicology*, C.M. Chambers, P.L. Chambers, and D.S. Davies, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 163–167.

- Colantoni, A., La Paglia, N., De Maria, N., Emanuele, M.A., Emanuele, N.V., Idilman, R., Harig, J., and Van Thiel, D.H. (2000). Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *24*, 1467–1473.
- Colas, J.-F., and Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics* *221*, 117–145.
- Collado, B., Carmena, M.J., Clemente, C., Prieto, J.C., and Bajo, A.M. (2007). Vasoactive intestinal peptide enhances growth and angiogenesis of human experimental prostate cancer in a xenograft model. *Peptides* *28*, 1896–1901.
- Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., Vecchio, D., and Arezzini, B. (2010). Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr* *5*, 101–109.
- Condro, M.C., Matynia, A., Foster, N.N., Ago, Y., Rajbhandari, A.K., Van, C., Jayaram, B., Parikh, S., Diep, A.L., Nguyen, E., et al. (2016). High-resolution characterization of a PACAP-EGFP transgenic mouse model for mapping PACAP-expressing neurons. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3827–3848.
- Connor, P.D., Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., and Barr, H.M. (2006). Effects of prenatal alcohol exposure on fine motor coordination and balance: A study of two adult samples. *Neuropsychologia* *44*, 744–751.
- Costa, E.T., Savage, D.D., and Valenzuela, C.F. (2000). A Review of the Effects of Prenatal or Early Postnatal Ethanol Exposure on Brain Ligand-Gated Ion Channels. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* *24*, 706–715.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., and Tomkins, D.M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *32*, 777–785.
- Crews, F.T., and Nixon, K. (2009). Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol and Alcoholism* *44*, 115–127.

- Crews, F.T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., and Nixon, K. (2006). Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience* 137, 437–445.
- Crocker, P., Sabiston, C., Forrester, S., Kowalski, N., Kowalski, K., and McDonough, M. (2003). Predicting Change in Physical Activity, Dietary Restraint, and Physique Anxiety in Adolescent Girls. *Can J Public Health* 94, 332–337.
- Crunkhorn, S. (2012). Deal watch: Abbott boosts investment in NRF2 activators for reducing oxidative stress. *Nature Reviews. Drug Discovery* 11, 96.
- Csanaky, K., Banki, E., Szabadfi, K., Reglodi, D., Tarcai, I., Czeglédi, L., Helyes, Z., Ertl, T., Gyarmati, J., Szanto, Z., et al. (2012). Changes in PACAP Immunoreactivity in Human Milk and Presence of PAC1 Receptor in Mammary Gland during Lactation. *J Mol Neurosci* 48, 631–637.
- Cullen, C.L., Burne, T.H.J., Lavidis, N.A., and Moritz, K.M. (2013). Low dose prenatal ethanol exposure induces anxiety-like behaviour and alters dendritic morphology in the basolateral amygdala of rat offspring. *PLoS ONE* 8, e54924.
- Cummings, K.J., Willie, C., and Wilson, R.J.A. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide maintains neonatal breathing but not metabolism during mild reductions in ambient temperature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R956-965.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W.L., Yanagawa, Y., Obata, K., and Yeh, H.H. (2008). Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J. Neurosci.* 28, 1854–1864.

-D-

- Dallinga, M.G., Habani, Y.I., Kayser, R.P., Van Noorden, C.J.F., Klaassen, I., and Schlingemann, R.O. (2020). IGF-binding proteins 3 and 4 are regulators of sprouting angiogenesis. *Mol Biol Rep* 47, 2561–2572.
- Daniel, P.B., and Habener, J.F. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression regulated by a testis-specific promoter in germ cells during spermatogenesis. *Endocrinology* 141, 1218–1227.

- Darland, D.C., Cain, J.T., Berosik, M.A., Saint-Geniez, M., Odens, P.W., Schaubhut, G.J., Frisch, S., Stemmer-Rachamimov, A., Darland, T., and D'Amore, P.A. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform regulation of early forebrain development. *Developmental Biology* 358, 9–22.
- Das, M., Vihlen, C.S., and Legradi, G. (2007). Hypothalamic and brainstem sources of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide nerve fibers innervating the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 500, 761–776.
- Dautzenberg, F.M., Mevenkamp, G., Wille, S., and Hauger, R.L. (1999). N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J. Neuroendocrinol.* 11, 941–949.
- Dejda, A., Jolivel, V., Bourgault, S., Seaborn, T., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2008). Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *J. Mol. Neurosci.* 36, 26–37.
- Dejda, A., Seaborn, T., Bourgault, S., Touzani, O., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). PACAP and a novel stable analog protect rat brain from ischemia: Insight into the mechanisms of action. *Peptides* 32, 1207–1216.
- Delcourt, N., Thouvenot, E., Chanrion, B., Galéotti, N., Jouin, P., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J* 26, 1542–1551.
- Delgado, M., and Ganea, D. (2003). Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *The FASEB Journal* 17, 1–18.
- Delgado, M., Leceta, J., and Ganea, D. (2003). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *J Leukoc Biol* 73, 155–164.
- Dembele, K., Yao, X.-H., Chen, L., and Nyomba, B.L.G. (2006). Intrauterine ethanol exposure results in hypothalamic oxidative stress and neuroendocrine alterations in adult rat offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R796-802.

- Denes, T., Veszprémi, B., Koppan, M., Tamas, A., Szogyi, D., Brubel, R., Németh, J., Shams, M., and Reglodi, D. (2020). Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human amniotic fluid samples. *Reproductive Biology*.
- Derer, P., and Derer, M. (1990). Cajal-retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* 36, 839–856.
- Desrumaux, C., Risold, P.-Y., Schroeder, H., Deckert, V., Masson, D., Athias, A., Laplanche, H., Le Guern, N., Blache, D., Jiang, X.-C., et al. (2005). Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *The FASEB Journal* 19, 296–297.
- Deutsch, P.J., and Sun, Y. (1992). The 38-amino acid form of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates dual signaling cascades in PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 267, 5108–5113.
- DeWit, D.J., Adlaf, E.M., Offord, D.R., and Ogborne, A.C. (2000). Age at First Alcohol Use: A Risk Factor for the Development of Alcohol Disorders. *AJP* 157, 745–750.
- Diamond, I., and Gordon, A.S. (1997). Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77, 1–20.
- Dias, B.G., and Ressler, K.J. (2013). PACAP and the PAC1 Receptor in Post-Traumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacol* 38, 245–246.
- DiCicco-Bloom, E., and Black, I.B. (1988). Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *PNAS* 85, 4066–4070.
- Dickson, L., and Finlayson, K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol. Ther.* 121, 294–316.
- Djonov, V., Baum, O., and Burri, P.H. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and Tissue Research* 314, 107–117.

- Do, H., Park, H.-J., Sohn, E.-H., Kim, B.-O., Um, S.H., Kwak, J.-H., Moon, E.-Y., Rhee, D.-K., and Pyo, S. (2013). Ethanol induces cell cycle arrest and triggers apoptosis via Sp1-dependent p75^{NTR} expression in human neuroblastoma cells. *Cell Biol Toxicol* 29, 365–380.
- Dogrukol-Ak, D., Tore, F., and Tuncel, N. (2004). Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1325–1340.
- Dohi, K., Mizushima, H., Nakajo, S., Ohtaki, H., Matsunaga, S., Aruga, T., and Shioda, S. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *Regul. Pept.* 109, 83–88.
- Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., and Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110, 1133–1151.
- Dong, J., Sulik, K.K., and Chen, S. (2008). Nrf2-Mediated Transcriptional Induction of Antioxidant Response in Mouse Embryos Exposed to Ethanol *in vivo*: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling* 10, 2023–2033.
- Dong, J., Sulik, K.K., and Chen, S. (2010). The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicology Letters* 193, 94–100.
- Douiri, S., Bahdoudi, S., Hamdi, Y., Cubi, R., Basille, M., Fournier, A., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., Vaudry, D., et al. (2016). Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 137, 913–930.
- Downing, C., Johnson, T.E., Larson, C., Leakey, T.I., Siegfried, R.N., Rafferty, T.M., and Cooney, C.A. (2011). Subtle decreases in DNA methylation and gene expression at the mouse *Igf2* locus following prenatal alcohol exposure: effects of a methyl-supplemented diet. *Alcohol* 45, 65–71.

- Downing, C., Flink, S., Florez-McClure, M.L., Johnson, T.E., Tabakoff, B., and Kechris, K.J. (2012). Gene Expression Changes in C57BL/6J and DBA/2J Mice Following Prenatal Alcohol Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 36, 1519–1529.
- Downward, J. (1999). How BAD phosphorylation is good for survival. *Nature Cell Biology* 1, E33–E35.
- Dragan, W.Ł., Czerski, P.M., and Dragan, M. (2017). PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype and problematic alcohol use in a sample of young women. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1483–1489.
- Draper, H.H., and Hadley, M. (1990). A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 20, 901–907.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., and Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal of Biochemistry* 267, 4912–4916.
- Druse, M.J., Tajuddin, N., Kuo, A., and Connerty, M. (1990). Effects of in utero ethanol exposure on the developing dopaminergic system in rats. *J. Neurosci. Res.* 27, 233–240.
- E-
- Edenberg, H.J. (2000). Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (Academic Press), pp. 295–341.
- Ehrig, T., Bosron, W.F., and Li, T.K. (1990). Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 25, 105–116.
- El Shawa, H., Abbott, C.W., and Huffman, K.J. (2013). Prenatal Ethanol Exposure Disrupts Intraneocortical Circuitry, Cortical Gene Expression, and Behavior in a Mouse Model of FASD. *Journal of Neuroscience* 33, 18893–18905.
- Emanuele, M.A., Tentler, J.J., Kirsteins, L., Emanuele, N.V., Lawrence, A., and Kelley, M.R. (1992). The effect of “binge” ethanol exposure on growth hormone and prolactin gene expression and secretion. *Endocrinology* 131, 2077–2082.

Enrico, P., and Diana, M. (2017). On the Accuracy of In Vivo Ethanol and Acetaldehyde Monitoring, a Key Tile in the Puzzle of Acetaldehyde as a Neuroactive Agent. *Front Behav Neurosci* 11.

Estonius, M., Svensson, S., and Höög, J.-O. (1996). Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Letters* 397, 338–342.

-F-

Falluel-Morel, A., Aubert, N., Vaudry, D., Basille, M., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2004). Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry* 91, 1231–1243.

Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Aubert, N., Galas, L., Benard, M., Basille, M., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2637–2642.

Falluel-Morel, A., Vaudry, D., Aubert, N., Galas, L., Benard, M., Basille, M., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2006). PACAP and ceramides exert opposite effects on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070, 265–270.

Falluel-Morel, A., Tascau, L.I., Sokolowski, K., Brabet, P., and DiCicco-Bloom, E. (2008). Granule Cell Survival is Deficient in PAC1^{-/-} Mutant Cerebellum. *J Mol Neurosci* 36, 38–44.

Farkas, O., Tamás, A., Zsombok, A., Reglodi, D., Pál, J., Büki, A., Lengvári, I., Povlishock, J.T., and Dóczi, T. (2004). Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a rat model of traumatic brain injury. *Regul. Pept.* 123, 69–75.

Fataccioli, V., Andraud, E., Gentil, M., French, S.W., and Rouach, H. (1999). Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology* 29, 14–20.

- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 64, 390–396.
- Favrais, G., Couvineau, A., Laburthe, M., Gressens, P., and Lelievre, V. (2007). Involvement of VIP and PACAP in neonatal brain lesions generated by a combined excitotoxic/inflammatory challenge. *Peptides* 28, 1727–1737.
- Ferraguti, G., Merlino, L., Battagliese, G., Piccioni, M.G., Barbaro, G., Carito, V., Messina, M.P., Scalese, B., Coriale, G., Fiore, M., et al. (2020). Fetus morphology changes by second-trimester ultrasound in pregnant women drinking alcohol. *Addiction Biology* 25.
- File, S.E., and Pellow, S. (1985). The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br J Pharmacol* 86, 729–735.
- Floyd, R.A., and Carney, J.M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* 32 *Suppl*, S22-27.
- Forman, H.J., Zhang, H., and Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* 30, 1–12.
- Fox, J.H., Hammack, S.E., and Falls, W.A. (2008). Exercise is associated with reduction in the anxiogenic effect of mCPP on acoustic startle. *Behavioral Neuroscience* 122, 943–948.
- Franklin, L., Deitz, J., Jirikowic, T., and Astley, S. (2008). Children With Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Problem Behaviors and Sensory Processing. *American Journal of Occupational Therapy* 62, 265–273.
- Fridolf, T., Sundler, F., and Ahrén, B. (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): occurrence in rodent pancreas and effects on insulin and glucagon secretion in the mouse. *Cell Tissue Res* 269, 275–279.
- Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.

-G-

- Galter, D., Carmine, A., Buervenich, S., Duester, G., and Olson, L. (2003). Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *European Journal of Biochemistry* 270, 1316–1326.
- Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795–805.
- Ganther, H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20, 1657–1666.
- García-Suástegui, W.A., Ramos-Chávez, L.A., Rubio-Osornio, M., Calvillo-Velasco, M., Atzin-Méndez, J.A., Guevara, J., and Silva-Adaya, D. (2017). The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1–14.
- Garro, A.J., McBeth, D.L., Lima, V., and Lieber, C.S. (1991). Ethanol Consumption Inhibits Fetal DNA Methylation in Mice: Implications for the Fetal Alcohol Syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15, 395–398.
- Gaytan, F., Martinez-Fuentes, A.J., Garcia-Navarro, F., Vaudry, H., and Aguilar, E. (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res* 276, 223–227.
- Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2000). Pituitary adelylate cyclase-activating peptide is an activator of vasoactive intestinal polypeptide gene transcription in human neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research* 79, 67–76.
- Geudens, I., and Gerhardt, H. (2011). Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 138, 4569–4583.
- Ghatei, M.A., Takahashi, K., Suzuki, Y., Gardiner, J., Jones, P.M., and Bloom, S.R. (1993). Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J. Endocrinol.* 136, 159–166.

- Ghouili, I., Bahdoudi, S., Morin, F., Amri, F., Hamdi, Y., Coly, P.M., Walet-Balieu, M.-L., Leprince, J., Zekri, S., Vaudry, H., et al. (2018). Endogenous Expression of ODN-Related Peptides in Astrocytes Contributes to Cell Protection Against Oxidative Stress: Astrocyte-Neuron Crosstalk Relevance for Neuronal Survival. *Mol Neurobiol* 55, 4596–4611.
- Gill, K., Menez, J.F., Lucas, D., and Deitrich, R.A. (1992). Enzymatic Production of Acetaldehyde from Ethanol in Rat Brain Tissue. *Alcoholism Clin Exp Res* 16, 910–915.
- Gil-Mohapel, J., Boehme, F., Kainer, L., and Christie, B.R. (2010). Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Res Rev* 64, 283–303.
- Gloddek, J., Pagotto, U., Paez Pereda, M., Arzt, E., Stalla, G.K., and Renner, U. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J. Endocrinol.* 160, 483–490.
- Goasduff, T., and Cederbaum, A.I. (1999). NADPH-Dependent Microsomal Electron Transfer Increases Degradation of CYP2E1 by the Proteasome Complex: Role of Reactive Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 370, 258–270.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Letters* 409, 57–62.
- Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78, 419–430.
- Goodlett, C.R., Horn, K.H., and Zhou, F.C. (2005). Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 394–406.
- Gordon, N. (2009). Spontaneous intracranial hypotension. *Dev Med Child Neurol* 51, 932–935.

- Goudable, J., and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11, 115–120.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.-C., De Neef, P., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1996). Effect of introduction of an Arginine16 in VIP, PACAP and secretin on ligand affinity for the receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1314, 267–273.
- Gourlet, P., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1997a). In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. *Peptides* 18, 1555–1560.
- Gourlet, P., Vandermeers, A., Vertongen, P., Rathe, J., De Neef, P., Cnudde, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (1997b). Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* 18, 1539–1545.
- de Graaf-Peters, V.B., and Hadders-Algra, M. (2006). Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? *Early Human Development* 82, 257–266.
- Grattagliano, I., Vendemiale, G., Didonna, D., Errico, F., Bolognino, A., Pistone, A., Cofano, M., Signorile, A., Ciannamea, F., and Altomare, E. (1995). Oxidative modification of proteins in chronic alcoholics. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 71, 189–195.
- Grattagliano, I., Vendemiale, G., Sabbà, C., Buonamico, P., and Altomare, E. (1996). Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xanthine oxidase. *J. Hepatol.* 25, 28–36.
- Gray, S.L., Cummings, K.J., Jirik, F.R., and Sherwood, N.M. (2001). Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol. Endocrinol.* 15, 1739–1747.
- Green, M.L., Singh, A.V., Zhang, Y., Nemeth, K.A., Sulik, K.K., and Knudsen, T.B. (2007). Reprogramming of genetic networks during initiation of the Fetal Alcohol Syndrome. *Developmental Dynamics* 236, 613–631.

- Gressens, P., Lammens, M., Picard, J.J., and Evrard, P. (1992). Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol Alcohol.* 27, 219–226.
- Gressens, P., Hill, J.M., Gozes, I., Fridkin, M., and Brenneman, D.E. (1993). Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature* 362, 155–158.
- Gressens, P., Hill, J.M., Painsaveine, B., Gozes, I., Fridkin, M., and Brenneman, D.E. (1994). Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *J Clin Invest* 94, 2020–2027.
- Gressens, P., Marret, S., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Gozes, I., Fridkin, M., and Evrard, P. (1997). Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J. Clin. Invest.* 100, 390–397.
- Guerri, C. (2001). Glia and Fetal Alcohol Syndrome. *NeuroToxicology* 22, 593–599.
- Guerri, C. (2002). Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox Res* 4, 327–335.
- Guerri, C., and Renau-Piqueras, J. (1997). Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol. Neurobiol.* 15, 65–81.
- Guerri, C., Pascual, M., and Renau-Piqueras, J. (2001). Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* 22, 593–599.
- Guirland, C., Buck, K.B., Gibney, J.A., DiCicco-Bloom, E., and Zheng, J.Q. (2003). Direct cAMP signaling through G-protein-coupled receptors mediates growth cone attraction induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Neurosci.* 23, 2274–2283.
- Guizzetti, M., Zhang, X., Goeke, C., and Gavin, D.P. (2014). Glia and Neurodevelopment: Focus on Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Front Pediatr* 2.

Gupta, A., Gargiulo, A.T., Curtis, G.R., Badve, P.S., Pandey, S., and Barson, J.R. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-27 (PACAP-27) in the Thalamic Paraventricular Nucleus Is Stimulated by Ethanol Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 42, 1650–1660.

-H-

Haghighi Poodeh, S., Salonurmi, T., Nagy, I., Koivunen, P., Vuoristo, J., Räsänen, J., Sormunen, R., Vainio, S., and Savolainen, M.J. (2012). Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers in vivo. *Placenta* 33, 866–873.

Halliwell, B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70, 737–757.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* 97, 1634–1658.

Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D., Leprince, J., Zarrouk, A., Hammami, M., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., and Masmoudi-Kouki, O. (2015). Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides* 71, 56–65.

Hamdi, Y., Madfai, H., Belhareth, R., Mokni, M., Masmoudi-Kouki, O., and Amri, M. (2016). Prenatal exposure to cigarette smoke enhances oxidative stress in astrocytes of neonatal rat. *Toxicology Mechanisms and Methods* 26, 231–237.

Hammack, S.E., Cheung, J., Rhodes, K.M., Schutz, K.C., Falls, W.A., Braas, K.M., and May, V. (2009). Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 34, 833–843.

Handmaker, N.S., Rayburn, W.F., Meng, C., Bell, J.B., Rayburn, B.B., and Rappaport, V.J. (2006). Impact of Alcohol Exposure After Pregnancy Recognition on Ultrasonographic Fetal Growth Measures. *Alcoholism Clin Exp Res* 30, 892–898.

- Hannibal, J., Mikkelsen, J.D., Clausen, H., Holst, J.J., Wulff, B.S., and Fahrenkrug, J. (1995). Gene expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.* 55, 133–148.
- Hannibal, J., Ekblad, E., Mulder, H., Sundler, F., and Fahrenkrug, J. (1997). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res* 291, 65–79.
- Haorah, J., Knipe, B., Leibhart, J., Ghorpade, A., and Persidsky, Y. (2005). Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1223–1232.
- Hard, M.L., Abdolell, M., Robinson, B.H., and Koren, G. (2005). Gene-expression analysis after alcohol exposure in the developing mouse. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 145, 47–54.
- Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S.P., et al. (1998). International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50, 265–270.
- Harmar, A.J., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Waser, B., Gugger, M., and Reubi, J.C. (2004). Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 145, 1203–1210.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. *Developmental Biology* 229, 15–30.
- Hashimoto, H., Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron* 11, 333–342.
- Hashimoto, H., Shintani, N., Tanaka, K., Mori, W., Hirose, M., Matsuda, T., Sakaue, M., Miyazaki, J., Niwa, H., Tashiro, F., et al. (2001). Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13355–13360.

- Hashimoto, I., Mashiko, T., and Imada, T. (1996). Somatic evoked high-frequency magnetic oscillations reflect activity of inhibitory interneurons in the human somatosensory cortex. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section 100*, 189–203.
- Hashimoto, M., Ohno, H., Kaga, M., Endo, K., Sano, H., and Oguchi, H. (2000). In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J. Dent. Res.* *79*, 1385–1391.
- Hashimoto, R., Hashimoto, H., Shintani, N., Chiba, S., Hattori, S., Okada, T., Nakajima, M., Tanaka, K., Kawagishi, N., Nemoto, K., et al. (2007). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is associated with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *12*, 1026–1032.
- Hashimoto, T., Elder, C.M., Okun, M.S., Patrick, S.K., and Vitek, J.L. (2003). Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J. Neurosci.* *23*, 1916–1923.
- Hattori, S., Takao, K., Tanda, K., Toyama, K., Shintani, N., Baba, A., Hashimoto, H., and Miyakawa, T. (2012). Comprehensive behavioral analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knockout mice. *Front Behav Neurosci* *6*, 58.
- Haycock, P.C. (2009). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: The Epigenetic Perspective. *Biol Reprod* *81*, 607–617.
- Heaton, M.B., Paiva, M., Mayer, J., and Miller, R. (2002). Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum. *Neuroscience Letters* *334*, 83–86.
- Heilig, M., and Koob, G.F. (2007). A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci.* *30*, 399–406.
- Hellems, K.G.C., Verma, P., Yoon, E., Yu, W., and Weinberg, J. (2008). Prenatal Alcohol Exposure Increases Vulnerability to Stress and Anxiety-Like Disorders in Adulthood. *Ann N Y Acad Sci* *1144*, 154–175.

- Hellemans, K.G.C., Sliwowska, J.H., Verma, P., and Weinberg, J. (2010). Prenatal alcohol exposure: Fetal programming and later life vulnerability to stress, depression and anxiety disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34, 791–807.
- Heller, M., and Burd, L. (2014). Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100, 277–283.
- Henderson, G.I., Devi, B.G., Perez, A., and Schenker, S. (1995). In Utero Ethanol Exposure Elicits Oxidative Stress in the Rat Fetus. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19, 714–720.
- Henderson, G.I., Chen, J.J., and Schenker, S. (1999). Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front. Biosci.* 4, D541-550.
- Hevner, R.F., Daza, R.A.M., Rubenstein, J.L.R., Stunnenberg, H., Olavarria, J.F., and Englund, C. (2003). Beyond Laminar Fate: Toward a Molecular Classification of Cortical Projection/Pyramidal Neurons. *Dev Neurosci* 25, 139–151.
- Heyne, G.W., Melberg, C.G., Doroodchi, P., Parins, K.F., Kietzman, H.W., Everson, J.L., Ansen-Wilson, L.J., and Lipinski, R.J. (2015). Definition of critical periods for Hedgehog pathway antagonist-induced holoprosencephaly, cleft lip, and cleft palate. *PLoS One* 10, e0120517.
- Hicks, S.D., Middleton, F.A., and Miller, M.W. (2010). Ethanol-induced methylation of cell cycle genes in neural stem cells. *Journal of Neurochemistry* 114, 1767–1780.
- Hill, J.M., Lee, S.J., Dibbern, D.A., Fridkin, M., Gozes, I., and Brenneman, D.E. (1999). Pharmacologically distinct vasoactive intestinal peptide binding sites: CNS localization and role in embryonic growth. *Neuroscience* 93, 783–791.
- Hipólito, L., Sánchez, M.J., Polache, A., and Granero, L. (2007). Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. *Curr. Drug Metab.* 8, 716–727.
- Hodge, R.D. (2004). Insulin-Like Growth Factor-I Accelerates the Cell Cycle by Decreasing G1 Phase Length and Increases Cell Cycle Reentry in the Embryonic Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience* 24, 10201–10210.

- Holt, S. (1981). Observations on the relation between alcohol absorption and the rate of gastric emptying. *Can Med Assoc J* 124, 267–297.
- Hong, M., and Krauss, R.S. (2012). Cdon mutation and fetal ethanol exposure synergize to produce midline signaling defects and holoprosencephaly spectrum disorders in mice. *PLoS Genet.* 8, e1002999.
- Hoshino, M., Li, M., Zheng, L.Q., Suzuki, M., Mochizuki, T., and Yanaihara, N. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide and vasoactive intestinal polypeptide: differentiation effects on human neuroblastoma NB-OK-1 cells. *Neuroscience Letters* 159, 35–38.
- Hosoya, M., Kimura, C., Ogi, K., Ohkubo, S., Miyamoto, Y., Kugoh, H., Shimizu, M., Onda, H., Oshimura, M., and Arimura, A. (1992). Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1129, 199–206.
- Hou, X., Vandermeers, A., Gourlet, P., Vandermeers-Piret, M.-C., and Robberecht, P. (1994). Structural requirements for the occupancy of rat brain PACAP receptors and adenylate cyclase activation. *Neuropharmacology* 33, 1189–1195.
- Hoyme, H.E., Kalberg, W.O., Elliott, A.J., Blankenship, J., Buckley, D., Marais, A.-S., Manning, M.A., Robinson, L.K., Adam, M.P., Abdul-Rahman, O., et al. (2016). Updated Clinical Guidelines for Diagnosing Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Pediatrics* 138, e20154256.
- Hu, Z., Lelievre, V., Rodriguez, W.I., Tam, J., Cheng, J.W., Cohen-Cory, S., and Waschek, J.A. (2001). Embryonic expression of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor gene in the frog *Xenopus laevis* neural tube. *Journal of Comparative Neurology* 441, 266–275.
- Huang, X., Li, J., Song, S., Wang, L., Lin, Z., Ouyang, Z., and Yu, R. (2019). Hormesis effect of hydrogen peroxide on the promoter activity of neuropeptide receptor PAC1-R. *Journal of Food Biochemistry* 43, e12877.

Hurtado-Chong, A., Yusta-Boyo, M.J., Vergaño-Vera, E., Bulfone, A., Pablo, F.D., and Vicario-Abejón, C. (2009). IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *European Journal of Neuroscience* 30, 742–755.

-I-

Idrovo, J.-P., Shults, J.A., Curtis, B.J., Chen, M.M., and Kovacs, E.J. (2019). Alcohol Intoxication and the Postburn Gastrointestinal Hormonal Response. *Journal of Burn Care & Research* 40, 785–791.

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., et al. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056–1060.

Inooka, H., Endo, S., Kitada, C., Mizuta, E., and Fujino, M. (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by ¹H NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40, 456–464.

Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., and Shirakawa, M. (2001). Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat. Struct. Biol.* 8, 161–165.

Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., and Nagata, S. (1992). Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8, 811–819.

Ito, Y., Arakawa, M., Ishige, K., and Fukuda, H. (1999). Comparative study of survival signal withdrawal- and 4-hydroxynonenal-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuroscience Research* 35, 321–327.

-J-

Jacobs, J.S., and Miller, M.W. (2001). Proliferation and death of cultured fetal neocortical neurons: effects of ethanol on the dynamics of cell growth. *J. Neurocytol.* 30, 391–401.

- Jamal, M., Ameno, K., Uekita, I., Kumihashi, M., Wang, W., and Ijiri, I. (2007). Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats. *Neurotoxicology* 28, 1245–1248.
- Jansen-Olesen, I., Goadsby, P.J., Uddman, R., and Edvinsson, L. (1994). Vasoactive intestinal peptide (VIP) like peptides in the cerebral circulation of the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 49, 97–103.
- Jaworski, D.M., and Proctor, M.D. (2000). Developmental regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and PAC(1) receptor mRNA expression in the rat central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 27–39.
- Jayakar, S., Pugh, P., Dale, Z., Starr, E., Cole, S., and Margiotta, J. (2014). PACAP induces plasticity at autonomic synapses by nAChR-dependent NOS1 activation and AKAP-mediated PKA targeting. *Molecular and Cellular Neuroscience* 63.
- Jégou, S., Ghazi, F.E., Lendeu, P.K. de, Marret, S., Laudenbach, V., Uguen, A., Marcorelles, P., Roy, V., Laquerrière, A., and Gonzalez, B.J. (2012). Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain. *Annals of Neurology* 72, 952–960.
- Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R.E., Izumi, Y., Benshoff, N.D., Dikranian, K., Zorumski, C.F., Olney, J.W., and Wozniak, D.F. (2003). Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits. *J. Neurosci.* 23, 876–882.
- Johansson, P.A., Dziegielewska, K.M., Liddelow, S.A., and Saunders, N.R. (2008). The blood–CSF barrier explained: when development is not immaturity. *BioEssays* 30, 237–248.
- Jolivel, V., Basille, M., Aubert, N., de Jouffrey, S., Ancian, P., Le Bigot, J.-F., Noack, P., Massonneau, M., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2009). Distribution and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the brain of non-human primates. *Neuroscience* 160, 434–451.
- Jones, A.W. (2019). Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. *WIREs Forensic Sci* 1.

- Jones, A.W., and Jönsson, K. (1994). Food-Induced Lowering of Blood-Ethanol Profiles and Increased Rate of Elimination Immediately After a Meal. *JFS* 39, 1084–1093.
- Jones, K.L., and Smith, D.W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302, 999–1001.
- Joo, K.M., Chung, Y.H., Kim, M.K., Nam, R.H., Lee, B.L., Lee, K.H., and Cha, C.I. (2004). Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 476, 388–413.
- Journot, L., Spengler, D., Pantaloni, C., Dumuis, A., Sebben, M., and Bockaert, J. (1994). The PACAP receptor: generation by alternative splicing of functional diversity among G protein-coupled receptors in nerve cells. *Semin. Cell Biol.* 5, 263–272.
- Julkunen, R.J.K., Di Padova, C., and Lieber, C.S. (1985). First pass metabolism of ethanol - A gastrointestinal barrier against the systematic toxicity of ethanol. *Life Sciences* 37, 567–573.
- K-**
- Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P.G., and Juurlink, B.H.J. (2000). Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry* 286, 35–37.
- Karacay, B., O’Dorisio, M.S., Summers, M., and Bruce, J. (2006). Regulation of Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Expression in Developing Nervous Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 165–174.
- Kärkkäinen, V., Pomeshchik, Y., Savchenko, E., Dhungana, H., Kurronen, A., Lehtonen, S., Naumenko, N., Tavi, P., Levonen, A.-L., Yamamoto, M., et al. (2014). Nrf2 Regulates Neurogenesis and Protects Neural Progenitor Cells Against A β Toxicity: Regulation and Protection of NPCs by Nrf2. *Stem Cells* 32, 1904–1916.
- Kawaguchi, C., Tanaka, K., Isojima, Y., Shintani, N., Hashimoto, H., Baba, A., and Nagai, K. (2003). Changes in light-induced phase shift of circadian rhythm in mice lacking PACAP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 169–175.

- Ke, R., Lok, S.I.S., Singh, K., Chow, B.K.C., and Lee, L.T.O. (2020). GIP receptor suppresses PAC1 receptor-mediated neuronal differentiation via formation of a receptor heterocomplex. *J Neurochem* jnc.15220.
- Kenna, K., De Matteo, R., Hanita, T., Rees, S., Sozo, F., Stokes, V., Walker, D., Bocking, A., Brien, J., and Harding, R. (2011). Daily ethanol exposure during late ovine pregnancy: physiological effects in the mother and fetus in the apparent absence of overt fetal cerebral dysmorphology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R926-936.
- Kerszberg, M., and Wolpert, L. (2007). Specifying Positional Information in the Embryo: Looking Beyond Morphogens. *Cell* 130, 205–209.
- Khalighi, M., Brzezinski, M., Chen, H., and Juchau, M. (1999). Inhibition of human prenatal biosynthesis of all-trans-retinoic acid by ethanol, ethanol metabolites, and products of lipid peroxidation reactions. *Biochemical Pharmacology* 57, 811–821.
- Khan, J.Y., and Black, S.M. (2003). Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr. Res.* 54, 77–82.
- Kiessling, K.H. (1962). The effect of acetaldehyde on rat brain mitochondria and its occurrence in brain after alcohol injection. *Exp. Cell Res.* 26, 432–434.
- Kim, H.J., Sohn, H.J., Ha, M., Han, J.Y., Kang, S.S., Choi, W.S., and Cho, G.J. (2005). Prepubertal chronic ethanol administration alters TTF-1 and Oct-2 expression in the hypothalamus of female rats. *Molecular Brain Research* 136, 262–266.
- Kim, W.-K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R.P., Gozes, I., and Jonakait, G.M. (2000). Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Inhibit Tumor Necrosis Factor- α Production in Injured Spinal Cord and in Activated Microglia via a cAMP-Dependent Pathway. *J Neurosci* 20, 3622–3630.
- Kimura, S., Ohshige, Y., Lin, L., Okumura, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N., and Shiotani, Y. (1994). Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Neuroendocrinol.* 6, 503–507.

- Kiss, P., Reglodi, D., Tamás, A., Lubics, A., Lengvári, I., Józsa, R., Somogyvári-Vigh, A., Szilvássy, Z., and Németh, J. (2007). Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 225–230.
- Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M. (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 239–267.
- Kleiber, M.L., Wright, E., and Singh, S.M. (2011). Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: Advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Behavioural Brain Research* 223, 376–387.
- Kleiber, M.L., Mantha, K., Stringer, R.L., and Singh, S.M. (2013). Neurodevelopmental alcohol exposure elicits long-term changes to gene expression that alter distinct molecular pathways dependent on timing of exposure. *J Neurodev Disord* 5, 6.
- Kleiber, M.L., Diehl, E.J., Laufer, B.I., Mantha, K., Chokroborty-Hoque, A., Alberry, B., and Singh, S.M. (2014). Long-term genomic and epigenomic dysregulation as a consequence of prenatal alcohol exposure: a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Front. Genet.* 5.
- Klintsova, A., Hamilton, G., and Boschen, K. (2012). Long-Term Consequences of Developmental Alcohol Exposure on Brain Structure and Function: Therapeutic Benefits of Physical Activity. *Brain Sciences* 3, 1–38.
- Klintsova, A.Y., Helfer, J.L., Calizo, L.H., Dong, W.K., Goodlett, C.R., and Greenough, W.T. (2007). Persistent Impairment of Hippocampal Neurogenesis in Young Adult Rats Following Early Postnatal Alcohol Exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31, 2073–2082.
- Kodituwakku, P.W. (2007). Defining the behavioral phenotype in children with fetal alcohol spectrum disorders: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31, 192–201.
- Koehling, U.M., and Amit, Z. (1992). Relationship between blood catalase activity and drinking history in a human population, a possible biological marker of the affinity to consume alcohol. *Alcohol Alcohol* 27, 181–188.

- Koechling, U.M., Amit, Z., and Negrete, J.C. (1995). Family History of Alcoholism and the Mediation of Alcohol Intake by Catalase: Further Evidence for Catalase as a Marker of the Propensity to Ingest Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19, 1096–1104.
- Koh, P.O., Kwak, S.D., Kim, H.J., Roh, G., Kim, J.H., Kang, S.S., Choi, W.S., and Cho, G.J. (2003). Expression patterns of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in the rat placenta. *Molecular Reproduction and Development* 64, 27–31.
- Koh, P.-O., Won, C.-K., Noh, H.-S., Cho, G.-J., and Choi, W.-S. (2005). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor mRNAs in human placenta. *J. Vet. Sci.* 6, 1–5.
- Komada, M., Hara, N., Kawachi, S., Kawachi, K., Kagawa, N., Nagao, T., and Ikeda, Y. (2017). Mechanisms underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol. *Scientific Reports* 7, 4934.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257, 806–809.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95–97.
- Koppan, M., Varnagy, A., Reglodi, D., Brubel, R., Nemeth, J., Tamas, A., Mark, L., and Bodis, J. (2012). Correlation Between Oocyte Number and Follicular Fluid Concentration of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Women After Superovulation Treatment. *J Mol Neurosci* 48, 617–622.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7, 617–635.

- Krueckl, S.L., Fradinger, E.A., and Sherwood, N.M. (2003). Developmental changes in the expression of growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *455*, 396–405.
- Kujoth, G.C. (2005). Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science* *309*, 481–484.
- Kumada, T., Lakshmana, M.K., and Komuro, H. (2006). Reversal of Neuronal Migration in a Mouse Model of Fetal Alcohol Syndrome by Controlling Second-Messenger Signalings. *J. Neurosci.* *26*, 742–756.
- Kumar, S., Pioszak, A., Zhang, C., Swaminathan, K., and Xu, H.E. (2011). Crystal Structure of the PAC1R Extracellular Domain Unifies a Consensus Fold for Hormone Recognition by Class B G-Protein Coupled Receptors. *PLoS One* *6*.
- L-
- Labouvie, E., Bates, M.E., and Pandina, R.J. (1997). Age of first use: its reliability and predictive utility. *J. Stud. Alcohol* *58*, 638–643.
- Laburthe, M., and Couvineau, A. (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul. Pept.* *108*, 165–173.
- Lacaille, H., Duterte-Boucher, D., Liot, D., Vaudry, H., Naassila, M., and Vaudry, D. (2015). Comparison of the deleterious effects of binge drinking-like alcohol exposure in adolescent and adult mice. *J. Neurochem.* *132*, 629–641.
- Lacaille, H., Duterte-Boucher, D., Vaudry, H., Zerdoumi, Y., Flaman, J.-M., Hashimoto, H., and Vaudry, D. (2017). PACAP Protects the Adolescent and Adult Mice Brain from Ethanol Toxicity and Modulates Distinct Sets of Genes Regulating Similar Networks. *Mol Neurobiol* *54*, 7534–7548.
- Laev, H., Karpiak, S.E., Gokhale, V.S., and Hungund, B.L. (1995). In Utero Ethanol Exposure Retards Growth and Alters Morphology of Cortical Cultures: GM1 Reverses Effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* *19*, 1226–1233.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A.M. (2001). Neuronal migration. *Mech. Dev.* *105*, 47–56.

- Lang, B., Song, B., Davidson, W., MacKenzie, A., Smith, N., McCaig, C.D., Harmar, A.J., and Shen, S. (2006). Expression of the human PAC1 receptor leads to dose-dependent hydrocephalus-related abnormalities in mice. *J. Clin. Invest.* *116*, 1924–1934.
- Lange, L.G., and Sobel, B.E. (1983). Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J. Clin. Invest.* *72*, 724–731.
- Lange, L.G., Bergmann, S.R., and Sobel, B.E. (1981). Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* *256*, 12968–12973.
- Laposata, E.A., Scherrer, D.E., Mazow, C., and Lange, L.G. (1987). Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J. Biol. Chem.* *262*, 4653–4657.
- Larroque, B. (1992). Chapter 2 Alcohol and the Fetus. *Int J Epidemiol* *21*, S8–S16.
- Laufer, B.I., Mantha, K., Kleiber, M.L., Diehl, E.J., Addison, S.M.F., and Singh, S.M. (2013). Long-lasting alterations to DNA methylation and ncRNAs could underlie the effects of fetal alcohol exposure in mice. *Disease Models & Mechanisms* *6*, 977–992.
- Lebel, C., Roussotte, F., and Sowell, E.R. (2011). Imaging the Impact of Prenatal Alcohol Exposure on the Structure of the Developing Human Brain. *Neuropsychol Rev* *21*, 102–118.
- Leceta, J., Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Ganea, D., and Delgado, M. (2000). Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci* *921*, 92–102.
- Leceta, J., Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Ganea, D., and Delgado, M. (2006). Receptors and Transcriptional Factors Involved in the Anti-Inflammatory Activity of VIP and PACAP. *Annals of the New York Academy of Sciences* *921*, 92–102.
- Lecuyer, M., Laquerrière, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jégou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., and Gonzalez, B.J. (2017). PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathologica Communications* *5*, 44.

- Lee, H.-S. (2015). Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients* 7, 9492–9507.
- Lee, M., Lelievre, V., Zhao, P., Torres, M., Rodriguez, W., Byun, J.Y., Doshi, S., Ioffe, Y., Gupta, G., de los Monteros, A.E., et al. (2001). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 21, 3849–3859.
- Lee, R.D., An, S.M., Kim, S.S., Rhee, G.S., Kwack, S.J., Seok, J.H., Chae, S.Y., Park, C.H., Choi, Y.W., Kim, H.S., et al. (2005). Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 2147–2162.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.-Y., Ioffe, Y., and Waschek, J.A. (2002). Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J. Neurosci. Res.* 67, 566–573.
- Lelievre, V., Ghiani, C.A., Seksenyan, A., Gressens, P., de Vellis, J., and Waschek, J.A. (2006). Growth factor-dependent actions of PACAP on oligodendrocyte progenitor proliferation. *Regul. Pept.* 137, 58–66.
- Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J.P., and Menuet, J.C. (1968). Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées. A propos de 127 cas. 25, 476–482.
- Leu, Y.-W., Chu, P.-Y., Chen, C.-M., Yeh, K.-T., Liu, Y.M., Lee, Y.-H., Kuo, S.-T., and Hsiao, S.-H. (2014). Early life ethanol exposure causes long-lasting disturbances in rat mesenchymal stem cells via epigenetic modifications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453, 338–344.
- Lewis, C.E., Thomas, K.G.F., Dodge, N.C., Molteno, C.D., Meintjes, E.M., Jacobson, J.L., and Jacobson, S.W. (2015). Verbal Learning and Memory Impairment in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 724–732.
- Li, Y. (2004). In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. *Pharmacological Research* 49, 467–473.

- Li, H., Gu, S., Cai, X., Speed, W.C., Pakstis, A.J., Golub, E.I., Kidd, J.R., and Kidd, K.K. (2008). Ethnic Related Selection for an ADH Class I Variant within East Asia. *PLOS ONE* 3, e1881.
- Li, H., Cao, L., Yi, P.-Q., Xu, C., Su, J., Chen, P.-Z., Li, M., and Chen, J.-Y. (2019). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ameliorates radiation-induced cardiac injury. *Am J Transl Res* 11, 6585–6599.
- Li, M., Maderdrut, J.L., Lertora, J.J.L., and Batuman, V. (2007). Intravenous infusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a patient with multiple myeloma and myeloma kidney: A case study. *Peptides* 28, 1891–1895.
- Li, Q., Goodchild, A.K., Seyedabadi, M., and Pilowsky, P.M. (2005). Pre-protachykinin A mRNA is colocalized with tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in bulbospinal neurons. *Neuroscience* 136, 205–216.
- Liddelow, S.A., Dziegielewska, K.M., Ek, C.J., Johansson, P.A., Potter, A.M., and Saunders, N.R. (2009). Cellular transfer of macromolecules across the developing choroid plexus of *Monodelphis domestica*. *European Journal of Neuroscience* 29, 253–266.
- Liebner, S., Czupalla, C.J., and Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 467–476.
- Lin, C.-H., Chiu, L., Lee, H.-T., Chiang, C.-W., Liu, S.-P., Hsu, Y.-H., Lin, S.-Z., Hsu, C.Y., Hsieh, C.-H., and Shyu, W.-C. (2015). PACAP38/PAC1 Signaling Induces Bone Marrow-Derived Cells Homing to Ischemic Brain. *Stem Cells* 33, 1153–1172.
- Lindberg, P.T., Mitchell, J.W., Burgoon, P.W., Beaulé, C., Weihe, E., Schäfer, M.K.-H., Eiden, L.E., Jiang, S.Z., and Gillette, M.U. (2019). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP)-Glutamate Co-transmission Drives Circadian Phase-Advancing Responses to Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell Projections by Suprachiasmatic Nucleus. *Front Neurosci* 13, 1281.
- Liu, P.K., Roberston, C.S., and Valadka, A. (2002). The Association Between Neuronal Nitric Oxide Synthase and Neuronal Sensitivity in the Brain After Brain Injury. *Ann N Y Acad Sci* 962, 226–241.

- Liu, Y., Balaraman, Y., Wang, G., Nephew, K.P., and Zhou, F.C. (2009). Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics* 4, 500–511.
- Lossi, L., and Gambino, G. (2008). Apoptosis of the cerebellar neurons. *Histol. Histopathol.* 23, 367–380.
- Lossi, L., and Merighi, A. (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* 69, 287–312.
- Lu, N., and DiCicco-Bloom, E. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3357–3362.
- Lu, N., Zhou, R., and DiCicco-Bloom, E. (1998). Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. *J. Neurosci. Res.* 53, 651–662.
- Luo, J., and Miller, M.W. (1998). Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Research Reviews* 27, 157–167.
- Luts, L., and Sundler, F. (1994). Peptide-containing nerve fibers in the parathyroid glands of different species. *Regulatory Peptides* 50, 147–158.
- Lutz, E.M., Ronaldson, E., Shaw, P., Johnson, M.S., Holland, P.J., and Mitchell, R. (2006). Characterization of novel splice variants of the PAC1 receptor in human neuroblastoma cells: consequences for signaling by VIP and PACAP. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 193–209.
- Lutz, G.E., Palmitier, R.A., An, K.N., and Chao, E.Y. (1993). Comparison of tibiofemoral joint forces during open-kinetic-chain and closed-kinetic-chain exercises. *J Bone Joint Surg Am* 75, 732–739.

-M-

- Mackay, R., and Cooper, T.A. (1996). Contaminant transport in heterogeneous porous media: a case study. 1. Site characterisation and deterministic modelling. *Journal of Hydrology* 175, 383–406.

- Maharaj, A.S.R., Saint-Geniez, M., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *The American Journal of Pathology* *168*, 639–648.
- Mai, H.N., Chung, Y.H., Shin, E.-J., Sharma, N., Jeong, J.H., Jang, C.-G., Saito, K., Nabeshima, T., Reglodi, D., and Kim, H.-C. (2018). IL-6 knockout mice are protected from cocaine-induced kindling behaviors; possible involvement of JAK2/STAT3 and PACAP signalings. *Food and Chemical Toxicology* *116*, 249–263.
- Maier, S.E., and West, J.R. (2001). Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* *23*, 49–57.
- Maier, S.E., Cramer, J.A., West, J.R., and Sohrabji, F. (1999a). Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb. *J. Neurobiol.* *41*, 414–423.
- Maier, S.E., Miller, J.A., Blackwell, J.M., and West, J.R. (1999b). Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *23*, 726–734.
- Maino, B., D'Agata, V., Severini, C., Ciotti, M.T., Calissano, P., Copani, A., Chang, Y.-C., DeLisi, C., and Cavallaro, S. (2015). *Igf1* and *Pacp* rescue cerebellar granule neurons from apoptosis via a common transcriptional program. *Cell Death Discovery* *1*, 1–8.
- Malatesta, P., and Gotz, M. (2013). Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* *140*, 483–486.
- Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D., and Fromenty, B. (2001). Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* *298*, 737–743.
- Manzano, J., and Salvador, A. (1993). Antecedents of severe affective (mood) disorders. Patients examined as children or adolescents and as adults. *Acta Paedopsychiatr* *56*, 11–18.

- Marjonen, H., Sierra, A., Nyman, A., Rogojin, V., Gröhn, O., Linden, A.-M., Hautaniemi, S., and Kaminen-Ahola, N. (2015). Early Maternal Alcohol Consumption Alters Hippocampal DNA Methylation, Gene Expression and Volume in a Mouse Model. *PLOS ONE* *10*, e0124931.
- Marjonen, H., Toivonen, M., Lahti, L., and Kaminen-Ahola, N. (2018). Early prenatal alcohol exposure alters imprinted gene expression in placenta and embryo in a mouse model. *PLOS ONE* *13*, e0197461.
- Marnett, L.J., Riggins, J.N., and West, J.D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* *111*, 583–593.
- Marquez, P., Bebawy, D., Lelièvre, V., Coûté, A.-C., Evans, C.J., Waschek, J.A., and Lutfy, K. (2009). The role of endogenous PACAP in motor stimulation and conditioned place preference induced by morphine in mice. *Psychopharmacology* *204*, 457–463.
- Martinez, C., Abad, C., Delgado, M., Arranz, A., Juarranz, M.G., Rodriguez-Henche, N., Brabet, P., Leceta, J., and Gomariz, R.P. (2002). Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 1053–1058.
- Marzagalli, R., Scuderi, S., Drago, F., Waschek, J., and Castorina, A. (2015). Emerging Role of PACAP as a New Potential Therapeutic Target in Major Diabetes Complications. *International Journal of Endocrinology* *2015*, 2–11.
- Masmoudi-Kouki, O., Douiri, S., Hamdi, Y., Kaddour, H., Bahdoudi, S., Vaudry, D., Basille, M., Leprince, J., Fournier, A., Vaudry, H., et al. (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Neurochem.* *117*, 403–411.
- Masuo, Y., Suzuki, N., Matsumoto, H., Tokito, F., Matsumoto, Y., Tsuda, M., and Fujino, M. (1993). Regional distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res.* *602*, 57–63.

- Masuo, Y., Tokito, F., Matsumoto, Y., Shimamoto, N., and Fujino, M. (1994). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its binding sites in the rat brain. *Neuroscience Letters* 170, 43–46.
- Masuo, Y., Noguchi, J., Morita, S., and Matsumoto, Y. (1995). Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res.* 700, 219–226.
- Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., et al. (1997). Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* 9, 461–466.
- Matsuno, R., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Watanabe, J., Yofu, S., Hayashi, D., Takeda, T., Nonaka, N., Seki, M., Nakamura, M., et al. (2008). Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regulatory Peptides* 145, 80–87.
- Mattson, S.N., Riley, E.P., Gramling, L., Delis, D.C., and Jones, K.L. (1998). Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology* 12, 146–153.
- Mattson, S.N., Roesch, S.C., Fagerlund, A., Autti-Rämö, I., Jones, K.L., May, P.A., Adnams, C.M., Konovalova, V., Riley, E.P., and Collaborative Initiative on Fetal Alcohol Spectrum Disorders (CIFASD) (2010). Toward a neurobehavioral profile of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34, 1640–1650.
- May, P.A., Baete, A., Russo, J., Elliott, A.J., Blankenship, J., Kalberg, W.O., Buckley, D., Brooks, M., Hasken, J., Abdul-Rahman, O., et al. (2014). Prevalence and Characteristics of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Pediatrics* 134, 855–866.
- McCulloch, D.A., Lutz, E.M., Johnson, M.S., MacKENZIE, C.J., and Mitchell, R. (2000). Differential Activation of Phospholipase D by VPAC and PAC1 Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 175–185.

- McIlvain, H.B., Baudy, A., Sullivan, K., Liu, D., Pong, K., Fennell, M., and Dunlop, J. (2006). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces differentiation in the neuronal F11 cell line through a PKA-dependent pathway. *Brain Research* 1077, 16–23.
- McRory, J.E., Parker, D.B., Ngamvongchon, S., and Sherwood, N.M. (1995). Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108, 169–177.
- McRory, J.E., Parker, R.L., and Sherwood, N.M. (1997). Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell Biol.* 16, 95–102.
- McTigue, D.M., and Tripathi, R.B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of Neurochemistry* 107, 1–19.
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides* 85, 9–24.
- Mercer, A., Rönnholm, H., Holmberg, J., Lundh, H., Heidrich, J., Zachrisson, O., Ossoinak, A., Frisé, J., and Patrone, C. (2004). PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 76, 205–215.
- Mercer, K.B., Dias, B., Shafer, D., Maddox, S.A., Mülle, J.G., Hu, P., Walton, J., and Ressler, K.J. (2016). Functional evaluation of a PTSD-associated genetic variant: estradiol regulation and ADCYAP1R1. *Transl Psychiatry* 6, e978.
- Mester, L., Kovacs, K., Racz, B., Solti, I., Atlasz, T., Szabadfi, K., Tamas, A., and Reglodi, D. (2011). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide is Protective Against Oxidative Stress in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Mol Neurosci* 43, 35–43.
- Meyer, D.K. (2006). The effects of PACAP on neural cell proliferation. *Regul. Pept.* 137, 50–57.

- Miao, L., and St Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 344–356.
- Miles, O.W., May, V., and Hammack, S.E. (2018). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) Signaling and the Dark Side of Addiction. *J Mol Neurosci.*
- Miles, O.W., May, V., and Hammack, S.E. (2019). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) Signaling and the Dark Side of Addiction. *J Mol Neurosci* 68, 453–464.
- Miller, M.W. (1988). Effect of Prenatal Exposure to Ethanol on the Development of Cerebral Cortex: I. Neuronal Generation. *Alcoholism Clin Exp Res* 12, 440–449.
- Miller, M.W., and Nowakowski, R.S. (1991). Effect of Prenatal Exposure to Ethanol on the Cell Cycle Kinetics and Growth Fraction in the Proliferative Zones of Fetal Rat Cerebral Cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15, 229–232.
- Miller, M.W., and Robertson, S. (1993). Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J. Comp. Neurol.* 337, 253–266.
- Miller, A.L., Verma, D., Grinninger, C., Huang, M.-C., and Goetzl, E.J. (2006). Functional Splice Variants of the Type II G Protein–Coupled Receptor (VPAC2) for Vasoactive Intestinal Peptide in Mouse and Human Lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1070, 422–426.
- Miller, L., Shapiro, A.M., Cheng, J., and Wells, P.G. (2013). The free radical spin trapping agent phenylbutylnitron reduces fetal brain DNA oxidation and postnatal cognitive deficits caused by in utero exposure to a non-structurally teratogenic dose of ethanol: A role for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 60, 223–232.
- Miller, M., Kaufman, G., Reed, G., Bilenker, R., and Schinzel, A. (1979). Familial, balanced insertional translocation of chromosome 7 leading to offspring with deletion and duplication of the inserted segment, 7p15 → 7p21. *American Journal of Medical Genetics* 4, 323–332.

- Miñana, R., Climent, E., Baretino, D., Segui, J.M., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (2000). Alcohol Exposure Alters the Expression Pattern of Neural Cell Adhesion Molecules During Brain Development. *Journal of Neurochemistry* 75, 954–964.
- Miura, A., Odahara, N., Tominaga, A., Inoue, K., Kambe, Y., Kurihara, T., and Miyata, A. (2012). Regulatory mechanism of PAC1 gene expression via Sp1 by nerve growth factor in PC12 cells. *FEBS Letters* 586, 1731–1735.
- Miyamoto, R.T., Osberger, M.J., Todd, S.L., Robbins, A.M., Stroer, B.S., Zimmerman-Phillips, S., and Carney, A.E. (1994). Variables affecting implant performance in children. *The Laryngoscope* 104, 1120–1124.
- Miyata, T. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133–3145.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., and Coy, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 567–574.
- Miyata, A., Jiang, L., Dahl, R.D., Kitada, C., Kubo, K., Fujino, M., Minamino, N., and Arimura, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 643–648.
- Miyata, N., Mori, T., Iwahori, K., and Fujita, M. (2000). Microbial decolorization of melanoidin-containing wastewaters: Combined use of activated sludge and the fungus *Coriolus hirsutus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89, 145–150.
- Moller, K., Zhang, Y.Z., Håkanson, R., Luts, A., Sjölund, B., Uddman, R., and Sundler, F. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 57, 725–732.
- de la Monte, S.M., and Kril, J.J. (2014). Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol* 127, 71–90.

- Montoliu, C., Vallés, S., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1994). Ethanol-Induced Oxygen Radical Formation and Lipid Peroxidation in Rat Brain: Effect of Chronic Alcohol Consumption. *Journal of Neurochemistry* *63*, 1855–1862.
- Moody, J.O., Ojo, O.O., Omotade, O.O., Adeyemo, A.A., Olumese, P.E., and Ogundipe, O.O. (2003). Anti-sickling potential of a Nigerian herbal formula (ajawaron HF) and the major plant component (*Cissus populnea* L. CPK). *Phytother Res* *17*, 1173–1176.
- Mooney, S., and Miller, M. (2007). Time-specific effects of ethanol exposure on cranial nerve nuclei: Gastrulation and neurogenesis. *Experimental Neurology* *205*, 56–63.
- Moreno, D., Gourlet, P., Neef, P.D., Cnudde, J., and Robberecht, P. (2000). Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC2 receptor. *Peptides*.
- Morio, H., Tatsuno, I., Hirai, A., Tamura, Y., and Saito, Y. (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Res.* *741*, 82–88.
- Morleo, M., Woolfall, K., Dedman, D., Mukherjee, R., Bellis, M.A., and Cook, P.A. (2011). Under-reporting of foetal alcohol spectrum disorders: an analysis of hospital episode statistics. *BMC Pediatrics* *11*.
- Moro, O., and Lerner, E.A. (1997). Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J. Biol. Chem.* *272*, 966–970.
- Moro, O., Wakita, K., Ohnuma, M., Denda, S., Lerner, E.A., and Tajima, M. (1999). Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor-specific antagonist. *J. Biol. Chem.* *274*, 23103–23110.
- Moroo, I., Tatsuno, I., Uchida, D., Tanaka, T., Saito, J., Saito, Y., and Hirai, A. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* *795*, 191–196.

- Mounien, L., Do Rego, J.-C., Bizet, P., Boutelet, I., Gourcerol, G., Fournier, A., Brabet, P., Costentin, J., Vaudry, H., and Jégou, S. (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits food intake in mice through activation of the hypothalamic melanocortin system. *Neuropsychopharmacology* 34, 424–435.
- Muralidharan, P., Sarmah, S., Zhou, F., and Marrs, J. (2013). Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) Associated Neural Defects: Complex Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Brain Sciences* 3, 964–991.
- Mustafa, T. (2013). Chapter Twenty-One - Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP): A Master Regulator in Central and Peripheral Stress Responses. In *Advances in Pharmacology*, L.E. Eiden, ed. (Academic Press), pp. 445–457.
- Mustafa, T., Jiang, S.Z., Eiden, A.M., Weihe, E., Thistlethwaite, I., and Eiden, L.E. (2015). Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice. *Stress* 18, 408–418.
- Mutlu-Türkoğlu, U., Doğru-Abbasoğlu, S., Aykaç-Toker, G., Mirsal, H., Beyazyürek, M., and Uysal, M. (2000). Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. *J. Lab. Clin. Med.* 136, 287–291.
- N-
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423–432.
- Nakamachi, T., Li, M., Shioda, S., and Arimura, A. (2006). Signaling involved in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated ADNP expression. *Peptides* 27, 1859–1864.
- Naninck, E.F.G., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S.E., Lucassen, P.J., and Korosi, A. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice: Chronic early life stress alters neurogenesis and cognition. *Hippocampus* 25, 309–328.

- Navasumrit, P., Ward, T., Dodd, N., and O'Connor, P. (2000). Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants. *Carcinogenesis* 21, 93–99.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., and Bush, A.I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharm.* 11.
- Nicole, P., Lins, L., Rouyer-Fessard, C., Drouot, C., Fulcrand, P., Thomas, A., Couvineau, A., Martinez, J., Brasseur, R., and Laburthe, M. (2000). Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J. Biol. Chem.* 275, 24003–24012.
- Nicot, A., and DiCicco-Bloom, E. (2001). Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4758–4763.
- Nicot, A., Lelièvre, V., Tam, J., Waschek, J.A., and DiCicco-Bloom, E. (2002). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Sonic Hedgehog Interact to Control Cerebellar Granule Precursor Cell Proliferation. *J. Neurosci.* 22, 9244–9254.
- Nielsen, K.M., Chaverra, M., Hapner, S.J., Nelson, B.R., Todd, V., Zigmond, R.E., and Lefcort, F. (2004). PACAP promotes sensory neuron differentiation: blockade by neurotrophic factors. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 629–641.
- Nixon, K., and Crews, F.T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 83, 1087–1093.
- Nizhnikov, M.E., Popoola, D.O., and Cameron, N.M. (2016). Transgenerational Transmission of the Effect of Gestational Ethanol Exposure on Ethanol Use-Related Behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 497–506.

- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *J. Neurosci.* 22, 3161–3173.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience* 7, 136–144.
- Nonaka, N., Shioda, S., and Banks, W.A. (2005). Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood–brain barrier. *Experimental Neurology* 191, 137–144.
- Nonaka, S., Shiratori, H., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2002). Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96–99.
- Nowak, J.Z., Kuba, K., and Zawilska, J.B. (1999). PACAP-induced formation of cyclic AMP in the chicken brain: regional variations and the effect of melatonin. *Brain Research* 830, 195–199.
- Nowoslawski, L., Klocke, B.J., and Roth, K.A. (2005). Molecular Regulation of Acute Ethanol-Induced Neuron Apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 490–497.
- Numakawa, T., Odaka, H., and Adachi, N. (2017). Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. *Int J Mol Sci* 18.

-O-

- O’Connor, M.J., and Paley, B. (2009). Psychiatric conditions associated with prenatal alcohol exposure. *Dev Disabil Res Revs* 15, 225–234.
- O’Donnell, M., Garippa, R.J., Rinaldi, N., Selig, W.M., Simko, B., Renzetti, L., Tannu, S.A., Wasserman, M.A., Welton, A., and Bolin, D.R. (1994). Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part I: In vitro and in vivo bronchodilator studies. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 1282–1288.

- Ogata, K., Shintani, N., Hayata-Takano, A., Kamo, T., Higashi, S., Seiriki, K., Momosaki, H., Vaudry, D., Vaudry, H., Galas, L., et al. (2015). PACAP Enhances Axon Outgrowth in Cultured Hippocampal Neurons to a Comparable Extent as BDNF. *PLoS One* *10*.
- Ogi, K., Kimura, C., Onda, H., Arimura, A., and Fujino, M. (1990). Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *173*, 1271–1279.
- Ogi, K., Miyamoto, Y., Masuda, Y., Habata, Y., Hosoya, M., Ohtaki, T., Masuo, Y., Onda, H., and Fujino, M. (1993). Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *196*, 1511–1521.
- Ogony, J.W., Malahias, E., Vadigepalli, R., and Anni, H. (2013). Ethanol Alters the Balance of Sox2, Oct4, and Nanog Expression in Distinct Subpopulations During Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development* *22*, 2196–2210.
- Ohkubo, S., Kimura, C., Ogi, K., Okazaki, K., Hosoya, M., Onda, H., Miyata, A., Arimura, A., and Fujino, M. (1992). Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol.* *11*, 21–30.
- Ohno, F., Watanabe, J., Sekihara, H., Hirabayashi, T., Arata, S., Kikuyama, S., Shioda, S., Nakaya, K., and Nakajo, S. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. *Regul. Pept.* *126*, 115–122.
- Ohta, S., Gregg, C., and Weiss, S. (2006). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates forebrain neural stem cells and neurogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience Research* *84*, 1177–1186.
- Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Aizawa, Y., Takaki, A., Hodoyama, K., Yofu, S., Hashimoto, H., Shintani, N., Baba, A., et al. (2006). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *PNAS* *103*, 7488–7493.

- Ohtaki, H., Satoh, A., Nakamachi, T., Yofu, S., Dohi, K., Mori, H., Ohara, K., Miyamoto, K., Hashimoto, H., Shintani, N., et al. (2010). Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J. Mol. Neurosci.* *42*, 397–403.
- Ohtsuka, M., Fukumitsu, H., and Furukawa, S. (2008). PACAP decides neuronal laminar fate via PKA signaling in the developing cerebral cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *369*, 1144–1149.
- Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* *276*, 38388–38393.
- Okazaki, S., Ishikawa, H., and Fujiwara, H. (1995). Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4545–4552.
- Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P., and Ikonomidou, C. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis* *5*, 515–521.
- Onoue, S., Endo, K., Ohshima, K., Yajima, T., and Kashimoto, K. (2002). The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* *23*, 1471–1478.
- Osborn, J.A., Kim, C.K., Steiger, J., and Weinberg, J. (1998). Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *22*, 685–696.
- Östberg, L.J., Persson, B., and Höög, J.-O. (2016). Computational studies of human class V alcohol dehydrogenase - the odd sibling. *BMC Biochemistry* *17*, 16.
- Otto, C., Martin, M., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Maldonado, R., and Schütz, G. (2001). Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *92*, 78–84.

-P-

- Padmanabhan, R., and Hameed, M.S. (1988). Effects of acute doses of ethanol administered at pre-implantation stages on fetal development in the mouse. *Drug and Alcohol Dependence* 22, 91–100.
- Pagé-Larivière, F., Campagna, C., and Sirard, M.-A. (2017). Mechanisms Involved in Porcine Early Embryo Survival following Ethanol Exposure. *Toxicol Sci* 156, 289–299.
- Palkovits, M., Somogyvári-Vigh, A., and Arimura, A. (1995). Concentrations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 699, 116–120.
- Panchenko, L.F., Pirozhkov, S.V., Popova, S.V., and Antonenkov, V.D. (1987). Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart. *Experientia* 43, 580–581.
- Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J., and Journot, L. (1996). Alternative Splicing in the N-terminal Extracellular Domain of the Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) Receptor Modulates Receptor Selectivity and Relative Potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in Phospholipase C Activation. *J. Biol. Chem.* 271, 22146–22151.
- Parker, D.B., Coe, I.R., Dixon, G.H., and Sherwood, N.M. (1993). Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *Eur. J. Biochem.* 215, 439–448.
- Parker, G., Roussos, J., Hadzi-Pavlovic, D., Mitchell, P., Wilhelm, K., and Austin, M.P. (1997). The development of a refined measure of dysfunctional parenting and assessment of its relevance in patients with affective disorders. *Psychol Med* 27, 1193–1203.
- Parkington, H.C., Kenna, K.R., Sozo, F., Coleman, H.A., Bocking, A., Brien, J.F., Harding, R., Walker, D.W., Morley, R., and Tare, M. (2014). Maternal alcohol consumption in pregnancy enhances arterial stiffness and alters vasodilator function that varies between vascular beds in fetal sheep. *The Journal of Physiology* 592, 2591–2603.

- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., and Caston, J. (2005). Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Developmental Brain Research* 160, 265–274.
- Pei, L. (1997). Genomic structure and embryonic expression of the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *Regulatory Peptides* 71, 153–161.
- Pei, J., Denys, K., Hughes, J., and Rasmussen, C. (2011). Mental health issues in fetal alcohol spectrum disorder. *Journal of Mental Health* 20, 473–483.
- Pellegrini, G., Magistretti, P.J., and Martin, J.L. (1998). VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones. *Eur. J. Neurosci.* 10, 272–280.
- Peng, Y., Kwok, K., Yang, P., Ng, S., Liu, J., Wong, O., He, M., Kung, H., and Lin, M. (2005). Ascorbic acid inhibits ROS production, NF- κ B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology* 48, 426–434.
- Perez, M.J., Velasco, E., Monte, M.J., Gonzalez-Buitrago, J.M., and Marin, J.J.G. (2006). Maternal ethanol consumption during pregnancy enhances bile acid-induced oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver. *Toxicology* 225, 183–194.
- Petrelli, B., Weinberg, J., and Hicks, G.G. (2018). Effects of prenatal alcohol exposure (PAE): insights into FASD using mouse models of PAE. *Biochem. Cell Biol.* 96, 131–147.
- Phillips, D.E., Krueger, S.K., Wall, K.A., Smoyer-Dearing, L.H., and Sikora, A.K. (1997). The development of the blood-brain barrier in alcohol-exposed rats. *Alcohol* 14, 333–343.
- Piggins, H.D., Stamp, J.A., Burns, J., Rusak, B., and Semba, K. (1996). Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J. Comp. Neurol.* 376, 278–294.
- Pikkarainen, P.H., and Rähä, N.C.R. (1967). Development of Alcohol Dehydrogenase Activity in the Human Liver. *Pediatr Res* 1, 165–168.

- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., and Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 233–239.
- Pinhasov, A., Neshet, E., Gross, M., Turgeman, G., Kreinin, A., and Yadid, G. (2011). The Role of the PACAP Signaling System in Depression.
- Pisegna, J.R., and Wank, S.A. (1996). Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 271, 17267–17274.
- Politi, L.E., Rotstein, N.P., and Carri, N.G. (2001). Effect of GDNF on Neuroblast Proliferation and Photoreceptor Survival: Additive Protection with Docosahexaenoic Acid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3008–3015.
- Popova, S., Lange, S., Probst, C., Parunashvili, N., and Rehm, J. (2017). Prevalence of alcohol consumption during pregnancy and Fetal Alcohol Spectrum Disorders among the general and Aboriginal populations in Canada and the United States. *European Journal of Medical Genetics* 60, 32–48.
- Popova, S., Lange, S., Shield, K., Burd, L., and Rehm, J. (2019). Prevalence of fetal alcohol spectrum disorder among special subpopulations: a systematic review and meta-analysis. *Addiction* 114, 1150–1172.

-Q-

- Qi, Y., Zhang, M., Li, H., Frank, J.A., Dai, L., Liu, H., and Chen, G. (2014). MicroRNA-29b Regulates Ethanol-induced Neuronal Apoptosis in the Developing Cerebellum through SP1/RAX/PKR Cascade. *J. Biol. Chem.* 289, 10201–10210.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS Cell Generation. *Neuron* 28, 69–80.
- Quertemont, E. (2004). Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Molecular Psychiatry* 9, 570–581.

Quintana-Cabrera, R., and Bolaños, J.P. (2013). Glutathione and γ -Glutamylcysteine in Hydrogen Peroxide Detoxification. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 129–144.

-R-

Rachdi, L., Marie, J.-C., and Scharfmann, R. (2003). Role for VPAC2 Receptor-Mediated Signals in Pancreas Development. *Diabetes* 52, 85–92.

Rácz, B., Gasz, B., Gallyas, F., Kiss, P., Tamás, A., Szántó, Z., Lubics, A., Lengvári, I., Tóth, G., Hegyi, O., et al. (2008). PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regulatory Peptides* 145, 105–115.

Radek, K.A., Matthies, A.M., Burns, A.L., Heinrich, S.A., Kovacs, E.J., and DiPietro, L.A. (2005). Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, H1084–H1090.

Radek, K.A., Kovacs, E.J., Gallo, R.L., and DiPietro, L.A. (2008). Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295, H174–H184.

Raghunathan, R., Wu, C., Singh, M., Liu, C.-H., Miranda, R.C., and Larin, K.V. (2018). Evaluating the effects of maternal alcohol consumption on murine fetal brain vasculature using optical coherence tomography. *J. Biophotonics* 11, e201700238.

Rajasinghe, H., Jayatileke, E., and Shaw, S. (1990). DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. *Life Sci.* 47, 807–814.

Ramachandran, V., Perez, A., Chen, J., Senthil, D., Schenker, S., and Henderson, G.I. (2001). In Utero Ethanol Exposure Causes Mitochondrial Dysfunction, Which Can Result in Apoptotic Cell Death in Fetal Brain: A Potential Role for 4-Hydroxynonenal. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25, 862–871.

- Ramachandran, V., Watts, L.T., Maffi, S.K., Chen, J., Schenker, S., and Henderson, G. (2003). Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research* 74, 577–588.
- Ramadoss, J., and Magness, R.R. (2012). Vascular effects of maternal alcohol consumption. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 303, H414–H421.
- Ramikie, T.S., and Ressler, K.J. (2016). Stress-related disorders, pituitary adenylate cyclase—activating peptide (PACAP)ergic system, and sex differences. *Dialogues Clin Neurosci* 18, 403–413.
- Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., and Soulimani, R. (2008). Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 22, 1156–1159.
- Rammal, H., Bouayed, J., and Soulimani, R. (2010). A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. *European Journal of Pharmacology* 627, 173–176.
- Randall, C.L., and Taylor, W.J. (1979). Prenatal ethanol exposure in mice: Teratogenic effects. *Teratology* 19, 305–311.
- Rangmar, J., Hjern, A., Vinnerljung, B., Stromland, K., Aronson, M., and Fahlke, C. (2015). Psychosocial Outcomes of Fetal Alcohol Syndrome in Adulthood. *PEDIATRICS* 135, e52–e58.
- Raoult, E., Bénard, M., Komuro, H., Lebon, A., Vivien, D., Fournier, A., Vaudry, H., Vaudry, D., and Galas, L. (2014). Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. *J. Neurochem.* 130, 241–254.
- Rat, D., Schmitt, U., Tippmann, F., Dewachter, I., Theunis, C., Wiczczak, E., Postina, R., van Leuven, F., Fahrenholz, F., and Kojro, E. (2011). Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer’s disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice. *The FASEB Journal* 25, 3208–3218.

- Ravni, A., Vaudry, D., Gerdin, M.J., Eiden, M.V., Falluel-Morel, A., Gonzalez, B.J., Vaudry, H., and Eiden, L.E. (2008). A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuritogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* 73, 1688–1708.
- Razumkina, E.V., Anokhin, P.K., Proskuryakova, T.V., and Shamakina, I.Yu. (2019). Experimental Approaches to the Study of Behavioral Impairments Associated with Prenatal Exposure to Alcohol. *Neurosci Behav Physi* 49, 894–902.
- Redmond, S.A., Figueres-Oñate, M., Obernier, K., Nascimento, M.A., Parraguez, J.I., López-Mascaraque, L., Fuentealba, L.C., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Development of Ependymal and Postnatal Neural Stem Cells and Their Origin from a Common Embryonic Progenitor. *Cell Reports* 27, 429-441.e3.
- Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., and Hol, E.M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front. Hum. Neurosci.* 10.
- Reglodi, D., Somogyvari-Vigh, A., Vigh, S., Kozicz, T., and Arimura, A. (2000). Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 31, 1411–1417.
- Reglodi, D., Tamás, A., Somogyvári-Vigh, A., Szántó, Z., Kertes, E., Lénárd, L., Arimura, A., and Lengvári, I. (2002). Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23, 2227–2234.
- Reglodi, D., Fábíán, Z., Tamás, A., Lubics, A., Szeberényi, J., Alexy, T., Tóth, K., Márton, Z., Borsiczky, B., Róth, E., et al. (2004). Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. *Regul. Pept.* 123, 51–59.
- Reglodi, D., Kiss, P., Lubics, A., and Tamas, A. (2011). Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.* 17, 962–972.

- Reglodi, D., Kiss, P., Szabadfi, K., Atlasz, T., Gabriel, R., Horvath, G., Szakaly, P., Sandor, B., Lubics, A., Laszlo, E., et al. (2012). PACAP is an endogenous protective factor—insights from PACAP-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* *48*, 482–492.
- Reglodi, D., Helyes, Z., Nemeth, J., Vass, R.A., and Tamas, A. (2016). PACAP as a Potential Biomarker: Alterations of PACAP Levels in Human Physiological and Pathological Conditions. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, D. Reglodi, and A. Tamas, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 815–832.
- Reglodi, D., Atlasz, T., Szabo, E., Jungling, A., Tamas, A., Juhasz, T., Fulop, B.D., and Bardosi, A. (2018). PACAP deficiency as a model of aging. *Geroscience* *40*, 437–452.
- Rehak, M., and Truitt, J.E. (1958). Anesthesia. 58. Biochemical effects of acetaldehyde and other aldehydes on oxidative phosphorylation. *Q J Stud Alcohol* *19*, 399–405.
- Reichlin, S. (1989). Neuroendocrinology of the pituitary gland. *Toxicol Pathol* *17*, 250–255.
- Ren, J.-C., Banan, A., Keshavarzian, A., Zhu, Q., LaPaglia, N., McNulty, J., Emanuele, N.V., and Emanuele, M.A. (2005). Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Alcohol* *35*, 91–101.
- Renis, M., Calabrese, V., Russo, A., Calderone, A., Barcellona, M.L., and Rizza, V. (1996). Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. *FEBS Letters* *390*, 153–156.
- Ressler, K.J., Mercer, K.B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., Norrholm, S.D., Kilaru, V., Smith, A.K., Myers, A.J., et al. (2011). Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature* *470*, 492–497.
- Reubi, J.C., Läderach, U., Waser, B., Gebbers, J.O., Robberecht, P., and Laissue, J.A. (2000). Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res.* *60*, 3105–3112.
- Reynolds, J.D., and Brien, J.F. (1994). Effects of acute ethanol exposure on glutamate release in the hippocampus of the fetal and adult guinea pig. *Alcohol* *11*, 259–267.
- Ribatti, D., Conconi, M.T., and Nussdorfer, G.G. (2007). Nonclassic Endogenous Novel Regulators of Angiogenesis. *Pharmacol Rev* *59*, 185–205.

- Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives* 108, 511–533.
- Ridge, J.W. (1963). The metabolism of acetaldehyde by the brain in vivo. *Biochem J* 88, 95–100.
- Riikonen, R.S., Nokelainen, P., Valkonen, K., Kolehmainen, A.I., Kumpulainen, K.I., Könönen, M., Vanninen, R.-L.S., and Kuikka, J.T. (2005). Deep Serotonergic and Dopaminergic Structures in Fetal Alcoholic Syndrome: A Study with nor- β -CIT-Single-Photon Emission Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Volumetry. *Biological Psychiatry* 57, 1565–1572.
- Riley, E.P., Shapiro, N.R., and Lochry, E.A. (1979). Nose-poking and head-dipping behaviors in rats prenatally exposed to alcohol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 11, 513–519.
- Riley, E.P., Infante, M.A., and Warren, K.R. (2011). Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview. *Neuropsychol Rev* 21, 73–80.
- Rintala, J., Jaatinen, P., Parkkila, S., Sarviharju, M., Kiiänmaa, K., Hervonen, A., and Niemelä, O. (2000). Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* 35, 458–463.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.
- Rivera-Pérez, J.A., and Hadjantonakis, A.-K. (2014). The Dynamics of Morphogenesis in the Early Mouse Embryo. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Robberecht, P., Woussen-Colle, M.C., De Neef, P., Gourlet, P., Buscail, L., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.C., and Christophe, J. (1991). The two forms of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP (1-27) and PACAP (1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR 4-2J cell membranes. *FEBS Lett.* 286, 133–136.

- Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M.C., Vandermeers-Piret, M.C., Vandermeers, A., and Christophe, J. (1992a). Receptor occupancy and adenylate cyclase activation in AR 4-2J rat pancreatic acinar cell membranes by analogs of pituitary adenylate cyclase-activating peptides amino-terminally shortened or modified at position 1, 2, 3, 20, or 21. *Mol. Pharmacol.* *42*, 347–355.
- Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M.C., Vandermeers-Piret, M.C., Vandermeers, A., and Christophe, J. (1992b). Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP(6-38) as a potent antagonist. *Eur. J. Biochem.* *207*, 239–246.
- Roberts, B.J., Song, B.-J., Soh, Y., Park, S.S., and Shoaf, S.E. (1995). Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J. Biol. Chem.* *270*, 29632–29635.
- Roebuck, T.M., Mattson, S.N., and Riley, E.P. (1999). Behavioral and psychosocial profiles of alcohol-exposed children. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *23*, 1070–1076.
- Rosenberg, M.J., Wolff, C.R., El-Emawy, A., Staples, M.C., Perrone-Bizzozero, N.I., and Savage, D.D. (2010). Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression. *Alcohol* *44*, 673–690.
- Rosenbloom, M., Sullivan, E.V., and Pfefferbaum, A. (2003). Using Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Imaging to Assess Brain Damage in Alcoholics. *Alcohol Res Health* *27*, 146–152.
- Ross, R.A., Hoepfner, S.S., Hellberg, S.N., O'Day, E.B., Rosencrans, P.L., Ressler, K.J., May, V., and Simon, N.M. (2020). Circulating PACAP peptide and PAC1R genotype as possible transdiagnostic biomarkers for anxiety disorders in women: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology* *45*, 1125–1133.
- Roth, B.L., and Beinfeld, M.C. (1985). The postnatal development of VIP binding sites in rat forebrain and hindbrain. *Peptides* *6*, 27–30.

- Rougemont, M., Do, K.Q., and Castagné, V. (2002). New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 70, 774–783.
- Rulten, S.L., Ripley, T.L., Hunt, C.L., Stephens, D.N., and Mayne, L.V. (2006). Sp1 and NFkappaB pathways are regulated in brain in response to acute and chronic ethanol. *Genes Brain Behav* 5, 257–273.
- Russell, M., and Skinner, J.B. (1988). Early Measures of Maternal Alcohol Misuse as Predictors of Adverse Pregnancy Outcomes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 12, 824–830.
- S-
- Saito, M., Chakraborty, G., Hui, M., Masiello, K., and Saito, M. (2016). Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain. *Brain Sciences* 6, 31.
- Salihu, H.M., Boos, R., and Schmidt, W. (1997). Antenatally detectable markers for the diagnosis of autosomally trisomic fetuses in at-risk pregnancies. *Am J Perinatol* 14, 257–261.
- Salonne, C., Fournié, A., Biquard, F., Gillard, P., and Descamps, P. (2004). Alcool et grossesse. *EMC - Gynécologie-Obstétrique* 1, 88–95.
- Sampson, P.D., Streissguth, A.P., Bookstein, F.L., Little, R.E., Clarren, S.K., Dehaene, P., Hanson, J.W., and Graham, J.M. (1997). Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology* 56, 317–326.
- Sanchis, R., Esquifino, A., and Guerri, C. (1985). Chronic ethanol intake modifies estrous cyclicity and alters prolactin and LH levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 23, 221–224.
- Sancho-Tello, M., Vallés, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1995). Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* 15, 157–166.

- Sari, Y., Hammad, L.A., Saleh, M.M., Rebec, G.V., and Mechref, Y. (2010). Alteration of selective neurotransmitters in fetal brains of prenatally alcohol-treated C57BL/6 mice: quantitative analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Int. j. Dev. Neurosci.* 28, 263–269.
- Sayasith, K., Brown, K.A., and Sirois, J. (2007). Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in ovarian follicles prior to ovulation. *Reproduction* 133, 441–453.
- Scaldeferri, M.L., Modesti, A., Palumbo, C., Ulisse, S., Fabbri, A., Piccione, E., Frajese, G., and Moretti, C. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP-receptor type 1 expression in rat and human placenta. *Endocrinology* 141, 1158–1167.
- Scharf, E., May, V., Braas, K.M., Shutz, K.C., and Mao-Draayer, Y. (2008). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate murine neural progenitor cell survival, proliferation, and differentiation. *J. Mol. Neurosci.* 36, 79–88.
- Schuckit, M.A. (2014). Recognition and Management of Withdrawal Delirium (Delirium Tremens). *N Engl J Med* 371, 2109–2113.
- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H., and Vaudry, D. (2011). Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr. Pharm. Des.* 17, 204–214.
- Seleverstov, O., Tobiasz, A., Jackson, J.S., Sullivan, R., Ma, D., Sullivan, J.P., Davison, S., Akkhwattanakul, Y., Tate, D.L., Costello, T., et al. (2017). Maternal alcohol exposure during mid-pregnancy dilates fetal cerebral arteries via endocannabinoid receptors. *Alcohol* 61, 51–61.
- Serreau, R., Maillard, T., Verdier, R., Bouchara, L., Catteau, C., Hervé, C., Fourmaintraux, A., Lamblin, D., Lesure, J.F., and Jacqz-Aigrain, E. (2002). Étude clinique et prévalence du syndrome d'alcoolisation fœtale pris en charge dans les établissements médicosociaux de l'île de la Réunion. *Archives de Pédiatrie* 9, 14–20.

- Sherwood, N.M., Krueckl, S.L., and McRory, J.E. (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.* 21, 619–670.
- Sheward, W.J., Lutz, E.M., and Harmar, A.J. (1996). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors in the early mouse embryo as assessed by reverse transcription polymerase chain reaction and in situ hybridisation. *Neurosci. Lett.* 216, 45–48.
- Shin, Y.-J., Choi, J.-S., Lee, J.-Y., Choi, J.-Y., Cha, J.-H., Chun, M.-H., and Lee, M.-Y. (2008). Differential regulation of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 116, 517.
- Shintani, N., Suetake, S., Hashimoto, H., Koga, K., Kasai, A., Kawaguchi, C., Morita, Y., Hirose, M., Sakai, Y., Tomimoto, S., et al. (2005). Neuroprotective action of endogenous PACAP in cultured rat cortical neurons. *Regulatory Peptides* 126, 123–128.
- Shioda, S. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the brain. *Kaibogaku Zasshi* 75, 487–507.
- Shioda, S., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Watanabe, J., Nakajo, S., Arata, S., Kitamura, S., Okuda, H., Takenoya, F., et al. (2006). Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070, 550–560.
- Shirpoor, A., Salami, S., Khadem-Ansari, M.H., Minassian, S., and Yegiazarian, M. (2009). Protective Effect of Vitamin E Against Ethanol-Induced Hyperhomocysteinemia, DNA Damage, and Atrophy in the Developing Male Rat Brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33, 1181–1186.
- Shivers, B.D., Görcs, T.J., Gottschall, P.E., and Arimura, A. (1991). Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology* 128, 3055–3065.

- Shukla, P.K., Sittig, L.J., Ullmann, T.M., and Redei, E.E. (2011). Candidate placental biomarkers for intrauterine alcohol exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35, 559–565.
- Shuto, Y., Uchida, D., Onda, H., and Arimura, A. (1996). Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor mRNA in the mouse brain. *Regul. Pept.* 67, 79–83.
- Siler-Khodr, T.M., Yang, Y., Grayson, M.H., Henderson, G.I., Lee, M., and Schenker, S. (2000). Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol* 21, 169–180.
- Silveri, M.M., and Spear, L.P. (2000). Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol* 20, 45–53.
- Simonneaux, V., Ouichou, A., and Pévet, P. (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res.* 603, 148–152.
- Singh, R.P., Shiue, K., Schomberg, D., and Zhou, F.C. (2009). Cellular Epigenetic Modifications of Neural Stem Cell Differentiation. *Cell Transplant* 18, 1197–1211.
- Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 14, 204–220.
- Snow, M.H.L. (1977). Gastrulation in the mouse: Growth and regionalization of the epiblast. *Development* 42, 293–303.
- Sokol, R.J., and Clarren, S.K. (1989). Guidelines for use of terminology describing the impact of prenatal alcohol on the offspring. *Alcohol Clin Exp Res* 13, 597–598.
- Sokoloff, L. (1999). Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem. Res.* 24, 321–329.
- Somogyvári-Vigh, A., and Reglodi, D. (2004). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: a potential neuroprotective peptide. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2861–2889.

- Somoskői, B., Török, D., Reglödi, D., Tamás, A., Fülöp, B.D., and Cseh, S. (2020). Possible effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on early embryo implantation marker HB-EGF in mouse. *Reprod Biol* 20, 9–13.
- Sowell, E.R., Jernigan, T.L., Mattson, S.N., Riley, E.P., Sobel, D.F., and Jones, K.L. (1996). Abnormal Development of the Cerebellar Vermis in Children Prenatally Exposed to Alcohol: Size Reduction in Lobules I–V. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 20, 31–34.
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Thompson, P.M., Jernigan, T.L., Riley, E.P., and Toga, A.W. (2001). Mapping callosal morphology and cognitive correlates: Effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology* 57, 235–244.
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Kan, E., Thompson, P.M., Riley, E.P., and Toga, A.W. (2008). Abnormal Cortical Thickness and Brain–Behavior Correlation Patterns in Individuals with Heavy Prenatal Alcohol Exposure. *Cereb Cortex* 18, 136–144.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., and Journot, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365, 170–175.
- Spong, C.Y., Lee, S.J., McCune, S.K., Gibney, G., Abebe, D.T., Alvero, R., Brenneman, D.E., and Hill, J.M. (1999). Maternal Regulation of Embryonic Growth: The Role of Vasoactive Intestinal Peptide. *Endocrinology* 140, 917–924.
- Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.X., and Goetzl, E.J. (1993). Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 546–553.
- Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Xia, M., Ichikawa, S., and Goetzl, E.J. (1994). Human vasoactive intestinal peptide1 receptors expressed by stable transfectants couple to two distinct signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 141–148.
- Sreedharan, S.P., Huang, J.X., Cheung, M.C., and Goetzl, E.J. (1995). Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2939–2943.

- Steel, G., and Lutz, E.M. (2007). Characterisation of the Mouse Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Type 2 Gene, *Vipr2*, and Identification of a Polymorphic LINE-1-like Sequence That Confers Altered Promoter Activity. *J Neuroendocrinol* 19, 14–25.
- Stevenson, R.E., Massey, P.S., Schroer, R.J., McDermott, S., and Richter, B. (1996). Preventable fraction of mental retardation: analysis based on individuals with severe mental retardation. *Ment Retard* 34, 182–188.
- Strömberg, P., and Höög, J.-O. (2000). Human Class V Alcohol Dehydrogenase (ADH5): A Complex Transcription Unit Generates C-Terminal Multiplicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278, 544–549.
- Stubbs, C.D., and Rubin, R. (1992). Effect of ethanol on platelet phospholipase A2. *Lipids* 27, 255–260.
- Stumm, R., Kolodziej, A., Prinz, V., Endres, M., Wu, D.-F., and Höllt, V. (2007). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *Journal of Neurochemistry* 103, 1666–1681.
- Subbanna, S., Nagre, N.N., Shivakumar, M., Umopathy, N.S., Psychoyos, D., and Basavarajappa, B.S. (2014). Ethanol induced acetylation of histone at G9a exon1 and G9a-mediated histone H3 dimethylation leads to neurodegeneration in neonatal mice. *Neuroscience* 258, 422–432.
- Suh, J., Lu, N., Nicot, A., Tatsuno, I., and DiCicco-Bloom, E. (2001). PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nature Neuroscience* 4, 123–124.
- Suk, K., Park, J.-H., and Lee, W.-H. (2004). Neuropeptide PACAP inhibits hypoxic activation of brain microglia: a protective mechanism against microglial neurotoxicity in ischemia. *Brain Res.* 1026, 151–156.
- Sulik, K.K. (1984). Critical periods for alcohol teratogenesis in mice, with special reference to the gastrulation stage of embryogenesis. *Ciba Found. Symp.* 105, 124–141.
- Sullivan, E.V., and Pfefferbaum, A. (2009). Neuroimaging of the Wernicke–Korsakoff Syndrome. *Alcohol Alcohol* 44, 155–165.

- Sumner, M., Bell, S., and Hwang, P.A. (2013). Fetal alcohol spectrum disorder: Epilepsy and neuropsychiatric disorders. *Clinical Neurophysiology* 124, e5.
- Suzuki, N., Harada, M., Kitada, C., Ohkubo, S., Matsumoto, H., Watanabe, T., Coy, D.H., Tsuda, M., Arimura, A., and Fujino, M. (1993). Production of immunoreactive pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) by human neuroblastoma cells, IMR-32: detection and characterization with monoclonal and polyclonal antibodies against different epitopes of PACAP. *J. Biochem.* 113, 549–556.
- Suzuki, N., Harada, M., Hosoya, M., and Fujino, M. (1994). Enhanced production of pituitary adenylyl-cyclase-activating polypeptide by 1, N⁶-dibutyryladenine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *European Journal of Biochemistry* 223, 147–153.
- Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S., and Shioda, S. (2003). A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. *Neurosci. Res.* 47, 451–454.
- Svoboda, M., Tastenoy, M., Vertongen, P., and Robberecht, P. (1994). Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 105, 131–137.
- T-
- Taberner, L., Verdaguer, N., Coll, M., Fita, I., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Rich, A., and Aymami, J. (1993). Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin. *Biochemistry* 32, 8403–8410.
- Takeda, K., Okamura, T., and Hasegawa, T. (1989). Sibs with tetrasomy 18p born to a mother with trisomy 18p. *Journal of Medical Genetics* 26, 195–197.
- Takei, N., Skoglösa, Y., and Lindholm, D. (1998). Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 54, 698–706.

- Takeuchi, S., Kawanai, T., Yamauchi, R., Chen, L., Miyaoka, T., Yamada, M., Asano, S., Hayata-Takano, A., Nakazawa, T., Yano, K., et al. (2020). Activation of the VPAC2 Receptor Impairs Axon Outgrowth and Decreases Dendritic Arborization in Mouse Cortical Neurons by a PKA-Dependent Mechanism. *Front. Neurosci.* *14*.
- Tamás, A., Reglődi, D., Szántó, Z., Borsiczky, B., Németh, J., and Lengvári, I. (2002). Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* *23*, 249–254.
- Tamás, A., Lubics, A., Lengvári, I., and Reglodi, D. (2006). Effects of age, gender, and gonadectomy on neurochemistry and behavior in animal models of Parkinson's disease. *Endocrine* *29*, 275–287.
- Tamas, A., Reglodi, D., Farkas, O., Kovesdi, E., Pal, J., Povlishock, J.T., Schwarcz, A., Czeiter, E., Szanto, Z., Doczi, T., et al. (2012). Effect of PACAP in Central and Peripheral Nerve Injuries. *Int J Mol Sci* *13*, 8430–8448.
- Tams, J.W., Johnsen, A.H., and Fahrenkrug, J. (1999). Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide1-38-binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *Biochem J* *341*, 271–276.
- Tanaka, K., Hashimoto, H., Shintani, N., Yamamoto, A., and Baba, A. (2004). Reduced hypothermic and hypnotic responses to ethanol in PACAP-deficient mice. *Regulatory Peptides* *123*, 95–98.
- Tanaka, K., Kunishige-Yamamoto, A., Hashimoto, H., Shintani, N., Hayata, A., and Baba, A. (2010). Increased ethanol preference and serotonin 1A receptor-dependent attenuation of ethanol-induced hypothermia in PACAP-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *391*, 773–777.
- Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N., Ohgane, J., Yanagimachi, R., and Shiota, K. (2001). Placentomegaly in Cloned Mouse Concepti Caused by Expansion of the Spongiotrophoblast Layer1. *Biology of Reproduction* *65*, 1813–1821.

- Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Development* 128, 1983–1993.
- Tarelo-Acuña, L., Olvera-Cortés, E., and González-Burgos, I. (2000). Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neuroscience Letters* 286, 13–16.
- Tata, J.R. (1998). Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 59, 433–442.
- Tateno, M., Ukai, W., Ozawa, H., Yamamoto, M., Toki, S., Ikeda, H., and Saito, T. (2004). Ethanol Inhibition of Neural Stem Cell Differentiation Is Reduced by Neurotrophic Factors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28, 134S-138S.
- Tatsuno, I., Gottschall, P.E., Köves, K., and Arimura, A. (1990). Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 1027–1033.
- Tatsuno, I., Somogyvari-Vigh, A., and Arimura, A. (1994). Developmental changes of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides* 15, 55–60.
- Terasaki, L.S., and Schwarz, J.M. (2016). Effects of Moderate Prenatal Alcohol Exposure during Early Gestation in Rats on Inflammation across the Maternal-Fetal-Immune Interface and Later-Life Immune Function in the Offspring. *J Neuroimmune Pharmacol* 11, 680–692.
- Terelius, Y., Norsten-Höög, C., Cronholm, T., and Ingelman-Sundberg, M. (1991). Acetaldehyde as a substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 689–694.
- Thompson, A., Hackman, D., and Burd, L. (2014). Mortality in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Open Journal of Pediatrics* 2014.

- Thum, T., and Borlak, J. (2000). Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *British Journal of Pharmacology* 130, 1745–1752.
- Todd, D., Bonthius, D.J., Sabalo, L.M., Roghair, J., Karacay, B., Bousquet, S.L., and Bonthius, D.J. (2018). Regional Patterns of Alcohol-Induced Neuronal Loss Depend on Genetics: Implications for Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 42, 1627–1639.
- Tomimoto, S., Ojika, T., Shintani, N., Hashimoto, H., Hamagami, K.-I., Ikeda, K., Nakata, M., Yada, T., Sakurai, Y., Shimada, T., et al. (2008). Markedly reduced white adipose tissue and increased insulin sensitivity in *adcyap1*-deficient mice. *J. Pharmacol. Sci.* 107, 41–48.
- Tong, C.K., and Vidyadaran, S. (2016). Role of microglia in embryonic neurogenesis: *Experimental Biology and Medicine*.
- Tyler, C.R., and Allan, A.M. (2014). Prenatal alcohol exposure alters expression of neurogenesis-related genes in an *ex vivo* cell culture model. *Alcohol* 48, 483–492.

-U-

- Uchida, D., Arimura, A., Somogyvári-Vigh, A., Shioda, S., and Banks, W.A. (1996). Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Brain Research* 736, 280–286.
- Uddman, R., Luts, A., Arimura, A., and Sundler, F. (1991). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a new vasoactive intestinal peptide (VIP)-like peptide in the respiratory tract. *Cell Tissue Res* 265, 197–201.
- Ungerer, M., Knezovich, J., and Ramsay, M. (2013). In Utero Alcohol Exposure, Epigenetic Changes, and Their Consequences. *Alcohol Res* 35, 37–46.
- Usdin, T.B., Bonner, T.I., and Mezey, E. (1994). Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135, 2662–2680.

-V-

- Valdehita, A., Carmena, M.J., Collado, B., Prieto, J.C., and Bajo, A.M. (2007). Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells. *Regulatory Peptides* *144*, 101–108.
- Valiante, V., Jain, R., Heinekamp, T., and Brakhage, A.A. (2009). The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* *46*, 909–918.
- Vallée, L., and Cuvellier, J.C. (2001). Syndrome d'alcoolisme fœtal: lésions du système nerveux central et phénotype clinique. *Pathologie Biologie* *49*, 732–737.
- Vallejo, I., and Vallejo, M. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces astrocyte differentiation of precursor cells from developing cerebral cortex. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 671–683.
- Varrault, A., Gueydan, C., Delalbre, A., Bellmann, A., Houssami, S., Akin, C., Severac, D., Chotard, L., Kahli, M., Le Digarcher, A., et al. (2006). Zac1 Regulates an Imprinted Gene Network Critically Involved in the Control of Embryonic Growth. *Developmental Cell* *11*, 711–722.
- Vasiliou, V., and Pappa, A. (2000). Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* *61*, 192–198.
- Vasiliou, D.V., Pappa, A., and Estey, T. (2004). Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism. *Drug Metabolism Reviews* *36*, 279–299.
- Vaudry, H., and Arimura, A. (2003). Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide (Springer US).
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Anouar, Y., Fournier, A., and Vaudry, H. (1998). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both c-fos gene expression and cell survival in rat cerebellar granule neurons through activation of the protein kinase A pathway. *Neuroscience* *84*, 801–812.

- Vaudry, D., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 9415–9420.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000a). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: From Structure to Functions. *Pharmacol Rev* *52*, 269–324.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Pamantung, T.F., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000b). PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *921*, 293–299.
- Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., and Gonzalez, B.J. (2002a). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 1451–1460.
- Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 6398–6403.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Basille, M., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2003a). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* *72*, 303–316.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2003b). Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science* *300*, 1532–1534.
- Vaudry, D., Hamelink, C., Damadzic, R., Eskay, R.L., Gonzalez, B., and Eiden, L.E. (2005). Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* *26*, 2518–2524.

- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., et al. (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev* 61, 283–357.
- Veazey, K.J., Carnahan, M.N., Muller, D., Miranda, R.C., and Golding, M.C. (2013). Alcohol-Induced Epigenetic Alterations to Developmentally Crucial Genes Regulating Neural Stemness and Differentiation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 37, 1111–1122.
- Villalba, M., Bockaert, J., and Journot, L. (1997). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP-38) Protects Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis by Activating the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase) Pathway. *J. Neurosci.* 17, 83–90.
- Vincze, A., Reglodi, D., Helyes, Z., Hashimoto, H., Shintani, N., and Abrahám, H. (2011). Role of endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in myelination of the rodent brain: lessons from PACAP-deficient mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 923–935.
- Virgintino, D., Maiorano, E., Errede, M., Vimercati, A., Greco, P., Selvaggi, L., Roncali, L., and Bertossi, M. (1998). Astroglia-microvessel relationship in the developing human telencephalon. *The International Journal of Developmental Biology*.
- Virgintino, D., Errede, M., Robertson, D., Girolamo, F., Masciandaro, A., and Bertossi, M. (2003). VEGF expression is developmentally regulated during human brain angiogenesis. *Histochem. Cell Biol.* 119, 227–232.

-W-

- Wakabayashi, N., Shin, S., Slocum, S.L., Agoston, E.S., Wakabayashi, J., Kwak, M.-K., Misra, V., Biswal, S., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2010). Regulation of Notch1 Signaling by Nrf2: Implications for Tissue Regeneration. *Science Signaling* 3, ra52–ra52.

- Wang, X., and Kroenke, C.D. (2015). Utilization of Magnetic Resonance Imaging in Research Involving Animal Models of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Res* 37, 39–51.
- Wang, G., Fu, Y., Li, J., Li, Y., Zhao, Q., Hu, A., Xu, C., Shao, D., and Chen, W. (2020). Aqueous extract of *Polygonatum sibiricum* ameliorates ethanol-induced mice liver injury via regulation of the Nrf2/ARE pathway. *J Food Biochem*.
- Wang, Y.-Q., Qian, Y.-P., Yang, S., Shi, H., Liao, C.-H., Zheng, H.-K., Wang, J., Lin, A.A., Cavalli-Sforza, L.L., Underhill, P.A., et al. (2005). Accelerated evolution of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor gene during human origin. *Genetics* 170, 801–806.
- Waschek, J.A., Ellison, J., Bravo, D.T., and Handley, V. (1996). Embryonic expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and VIP receptor genes. *J. Neurochem.* 66, 1762–1765.
- Waschek, J.A., Casillas, R.A., Nguyen, T.B., DiCicco-Bloom, E.M., Carpenter, E.M., and Rodriguez, W.I. (1998). Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9602–9607.
- Wass, T.S., Persutte, W.H., and Hobbins, J.C. (2001). The impact of prenatal alcohol exposure on frontal cortex development in utero. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 185, 737–742.
- Watanabe, J., Seki, T., and Shioda, S. (2016). PACAP and Neural Development. In *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP*, D. Reglodi, and A. Tamas, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 65–82.
- Webster, W.S., Walsh, D.A., McEwen, S.E., and Lipson, A.H. (1983). Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: Implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology* 27, 231–243.
- Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., Ma, Y.S., and Lee, H.C. (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease—consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 44, 1–11.

- Wentzel, P., and Eriksson, U.J. (2009). Altered gene expression in neural crest cells exposed to ethanol in vitro. *Brain Research* 1305, S50–S60.
- Westerlund, M., Galter, D., Carmine, A., and Olson, L. (2005). Tissue- and species-specific expression patterns of class I, III, and IV Adh and Aldh1 mRNAs in rodent embryos. *Cell Tissue Res* 322, 227–236.
- Williams, K., Frayne, J., and Hall, L. (1998). Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Mol Hum Reprod* 4, 841–848.
- Wolf, N., and Kriegstein, K. (1995). Phenotypic development of neonatal rat chromaffin cells in response to adrenal growth factors and glucocorticoids: focus on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neuroscience Letters* 200, 207–210.
- Wolpert, L. (1992). Gastrulation and the evolution of development. *Development* 116, 7–13.
- Wolpert, L., Tickle, C., and Arias, A.M. (2015). *Principles of Development* (Oxford University Press).
- Wong, F.K., and Marín, O. (2019). Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 35, 523–542.
- Wu, H., Cai, P., Clemens, D.L., Jerrells, T.R., Ansari, G.A.S., and Kaphalia, B.S. (2006). Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: Role of nonoxidative metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216, 238–247.
- Wu, J.Y., Henins, K.A., Gressens, P., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., and Hill, J.M. (1997). Neurobehavioral Development of Neonatal Mice Following Blockade of VIP During the Early Embryonic Period. *Peptides* 18, 1131–1137.
- X-
- Xia, M., Sreedharan, S.P., Bolin, D.R., Gaufo, G.O., and Goetzl, E.J. (1997). Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 629–633.

- Xu, J., Yeon, J.E., Chang, H., Tison, G., Chen, G.J., Wands, J., and de la Monte, S. (2003). Ethanol impairs insulin-stimulated neuronal survival in the developing brain: role of PTEN phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278, 26929–26937.
- Xu, Y., Liu, P., and Li, Y. (2005). Impaired development of mitochondria plays a role in the central nervous system defects of fetal alcohol syndrome. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 73, 83–91.
- Xue, M., and Del Bigio, M.R. (2005). Injections of blood, thrombin, and plasminogen more severely damage neonatal mouse brain than mature mouse brain. *Brain Pathol.* 15, 273–280.
- Y-
- Yaka, R., He, D.-Y., Phamluong, K., and Ron, D. (2003). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1. *J Biol Chem* 278, 9630–9638.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998a). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23, 33–42.
- Yamamoto, K., Hashimoto, H., Hagihara, N., Nishino, A., Fujita, T., Matsuda, T., and Baba, A. (1998b). Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene* 211, 63–69.
- Yan, Y., Zhou, X., Pan, Z., Ma, J., Waschek, J.A., and DiCicco-Bloom, E. (2013). Pro- and anti-mitogenic actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in developing cerebral cortex: potential mediation by developmental switch of PAC1 receptor mRNA isoforms. *J. Neurosci.* 33, 3865–3878.
- Yang, R., Jiang, X., Ji, R., Meng, L., Liu, F., Chen, X., and Xin, Y. (2015). Therapeutic potential of PACAP for neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20, 265–278.

Yanni, P.A., and Lindsley, T.A. (2000). Ethanol inhibits development of dendrites and synapses in rat hippocampal pyramidal neuron cultures. This paper was submitted by P.A.Y. in partial fulfillment of the requirement for the degree Doctor of Philosophy. *Developmental Brain Research* 120, 233–243.

Yates, W.R., Cadoret, R.J., Troughton, E.P., Stewart, M., and Giunta, T.S. (1998). Effect of Fetal Alcohol Exposure on Adult Symptoms of Nicotine, Alcohol, and Drug Dependence. *Alcoholism Clin Exp Res* 22, 914–920.

-Z-

Zakhari, S. (2006). Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Res Health* 29, 245–254.

Zelner, I., and Koren, G. (2013). Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 20, e259-265.

Zelner, I., Matlow, J.N., Natekar, A., and Koren, G. (2013). Synthesis of fatty acid ethyl esters in mammalian tissues after ethanol exposure: a systematic review of the literature. *Drug Metabolism Reviews* 45, 277–299.

Zhang, C.R., Ho, M.-F., Vega, M.C.S., Burne, T.H.J., and Chong, S. (2015). Prenatal ethanol exposure alters adult hippocampal VGLUT2 expression with concomitant changes in promoter DNA methylation, H3K4 trimethylation and miR-467b-5p levels. *Epigenetics & Chromatin* 8, 40.

Zhang, Y., Wang, H., Li, Y., and Peng, Y. (2018). A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress. *International Journal of Developmental Neuroscience* 71, 140–145.

Zhao, F., Wu, T., Lau, A., Jiang, T., Huang, Z., Wang, X.-J., Chen, W., Wong, P.K., and Zhang, D.D. (2009). Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 867–879.

Zhou, C., Kikuyama, S., Nakajo, S., Hirabayashi, T., Mizushima, H., and Shioda, S. (2000). Splice variants of PAC(1) receptor during early neural development of rats. *Peptides* 21, 1177–1183.

- Zhou, F.C., Zhao, Q., Liu, Y., Goodlett, C.R., Liang, T., McClintick, J.N., Edenberg, H.J., and Li, L. (2011). Alteration of gene expression by alcohol exposure at early neurulation. *BMC Genomics* 12, 124.
- Zhou, R., Wang, S., and Zhu, X. (2012). Prenatal Ethanol Exposure Alters Synaptic Plasticity in the Dorsolateral Striatum of Rat Offspring via Changing the Reactivity of Dopamine Receptor. *PLoS ONE* 7, e42443.
- Zhou, X., Rodriguez, W.I., Casillas, R.A., Ma, V., Tam, J., Hu, Z., Lelievre, V., Chao, A., and Waschek, J.A. (1999). Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J. Neurosci. Res.* 57, 953–961.
- Zhu, L., Tamvakopoulos, C., Xie, D., Dragovic, J., Shen, X., Fenyk-Melody, J.E., Schmidt, K., Bagchi, A., Griffin, P.R., Thornberry, N.A., et al. (2003). The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J. Biol. Chem.* 278, 22418–22423.
- Zimatkin, S.M. (1991). Histochemical Study of Aldehyde Dehydrogenase in the Rat CNS. *Journal of Neurochemistry* 56, 1–11.
- Zimatkin, S., and Lindros, K. (1996). Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol and Alcoholism*.
- Zimatkin, S.M., and Deitrich, R.A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology* 2, 387–400.
- Zimatkin, S.M., Pronko, S.P., Vasiliou, V., Gonzalez, F.J., and Deitrich, R.A. (2006). Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 30, 1500–1505.
- Zusev, M., and Gozes, I. (2004). Differential regulation of activity-dependent neuroprotective protein in rat astrocytes by VIP and PACAP. *Regulatory Peptides* 123, 33–41.