Différences mâles/femelles dans les effets de l'éthanol sur la plasticité hippocampique chez le rat adolescent : rôle des œstrogènes

Kevin Rabiant

▶ **To cite this version:**

Kevin Rabiant. Différences mâles/femelles dans les effets de l'éthanol sur la plasticité hippocampique chez le rat adolescent : rôle des œstrogènes. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2020. Français. NNT : 2020AMIE0038 . tel-03626205

HAL Id: tel-03626205
https://theses.hal.science/tel-03626205

Submitted on 31 Mar 2022

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.

Thèse de Doctorat

Mention Biologie
Spécialité Neurosciences

présentée à *l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

Kevin RABIANT

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Différences mâles/femelles dans les effets de l'éthanol sur la plasticité hippocampique chez le rat adolescent: rôle des œstrogènes

Soutenue le 6 novembre 2020, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. QUERTEMONT Etienne, Professeur, Université de Liège	**Rapporteur**
M. RAMPIN Olivier, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	**Rapporteur**
M. NAASSILA Mickaël, Professeur, Université Picardie Jules Verne	**Examinateur**
M. PIERREFICHE Olivier, Professeur, Université Picardie Jules Verne	**Directeur de thèse**

GROUPE DE RECHERCHE SUR L'ALCOOL & LES PHARMACODÉPENDANCES

Thèse de Doctorat

Mention Biologie
Spécialité Neurosciences

présentée à ***l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)***

de l'Université de Picardie Jules Verne

Kevin RABIANT

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Différences mâles/femelles dans les effets de l'éthanol sur la plasticité hippocampique chez le rat adolescent: rôle des œstrogènes

Soutenue le 6 novembre 2020, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. QUERTEMONT Etienne, Professeur, Université de Liège	**Rapporteur**
M. RAMPIN Olivier, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	**Rapporteur**
M. NAASSILA Mickaël, Professeur, Université Picardie Jules Verne	**Examinateur**
M. PIERREFICHE Olivier, Professeur, Université Picardie Jules Verne	**Directeur de thèse**

Cette thèse a été réalisée au sein du Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP INSERM UMR-1247) situé au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université Picardie Jules Verne, Chemin du Thil, 80025 Amiens Cédex 1

Le financement dont j'ai bénéficié au cours de ma thèse a été octroyée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté ma requête et de m'avoir consacrée une partie de leur temps.

Le Dr. **Rampin Olivier**, directeur de recherche à l'INRAE, UMR914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire.

Le Pr. **Quertemont Etienne**, directeur de recherche de PsyNCog, à l'Université de Liège

Je vous remercie chaleureusement pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse et pour le temps que vous m'avez consacré en siégeant à mon jury de thèse malgré cette période difficile.

Le Pr. **Naassila Mickaël**, professeur de l'Université Picardie Jules Verne et Directeur de mon laboratoire. Je le remercie chaudement de m'avoir accueilli dans ses locaux pendant la quasi-totalité de mes années universitaires. Sa rigueur scientifique et son franc-parler m'ont aidé à progresser et à me prendre en main dès le début de ma thèse. Pour ses conseils et son expertise sur les sciences et la présentation orale, je le remercie.

Le Pr. **Pierrefiche Olivier**, professeur de l'Université Picardie Jules Verne et Directeur de thèse. Je le remercie chaleureusement de m'avoir invité dans le laboratoire dès ma seconde année de Licence. Pour sa patience, sa sollicitude et l'aide dont il a su me faire profiter pendant ma thèse ainsi que la confiance qu'il m'a accordé dans divers projets de médiation, je le remercie. Me manqueront sa verve, son humour et sa bonne humeur communicante qu'il sait distribuer au sein du laboratoire. Ces moments seront difficiles à retrouver.

Je remercie les membres du laboratoire, maintenant trop nombreux pour n'oublier personnes.

Je remercie Elodie pour sa bonne humeur et son efficacité, la meilleure secrétaire que l'on puisse souhaiter, Johann pour son aide dans mes expériences. Je remercie les Dr. Vilpoux Catherine, Jeanblanc Jérôme et Houchi Hakim qui m'ont vu grandir au sein du laboratoire. Pour vos conseils, votre convivialité et le soutien que vous avez pu me procurer, je vous remercie. Je remercie également les animalières Anaïs et particulièrement Virginie pour l'aide

et la compréhension dont elles ont pu faire à mon égard. Je remercie Margaret et son charme à l'américaine, pour ses conseils et sa bienveillance. Enfin je remercie Ingrid Marcq et Hicham Bouhlal pour leur gentillesse.

Je tenais à remercier particulièrement le Dr. Peineau Stéphane pour les conseils qu'il m'a apporté, pour sa rigueur scientifique et son amitié. Il m'a ouvert les yeux sur le monde de la recherche et m'a conseillé la Gordon Research Conference qui reste, pour moi, l'une des expériences les plus épanouissantes de ma thèse. Pour tout cela je lui en suis reconnaissant et lui souhaite beaucoup de succès dans ses entreprises futures. Je ne manquerais pas de rendre visite à ta bibliothèque !

Je voulais également réserver un mot pour les thésards comme moi qui ont quitté le laboratoire où qui travaillent encore sur leur thèse. Un premier mot pour Benoît qui m'a tout appris, aux côtés d'Alexandre, sans qui je ne saurais pas faire une chirurgie et m'occuper d'un poste d'électrophysiologie de main maître ! Merci les gars c'était une superbe expérience. Merci à Romain et Fabien, avec qui j'ai eu moins d'interactions mais qui ont su marqué le laboratoire de leur présence. Merci également à Sophie et Carmen pour leur sollicitude et leurs conseils pendant mes premières années de thèse, merci à Ichrak malgré nos prises de bec, merci à Chloé pour sa compréhension et son soutien et merci à Greg et Charles-Antoine pour nos discussions et leur bienveillance. Merci à Cédric qui a rejoint notre bureau peu de temps après nous et qui est vite devenu un incontournable de nos soirées. J'ai une pensée particulière pour toi et tes efforts et je te souhaite le meilleur à venir.

Bien entendu le meilleur pour la fin, je remercie Pierre pour m'avoir accompagné dans cette folle aventure depuis le tout début de mes années universitaires. D'abord mentor durant ma première année de médecine, à camarade trois ans après en Licence 2, je ne comprends toujours pas ton parcours mais nous étions faits pour partager cette thèse ensemble. Maintenant mon meilleur ami, témoin de mariage et maître Lamasticot, je te souhaite le meilleur pour l'avenir dans lequel je ne manquerais pas de prendre une place toujours aussi importante !

Aussi je voudrais remercier mes amis, Arthur pour son omniprésence dans toutes les situations, Paulo pour ses longues discussions, Marine pour nos débats et nos soirées que nous partageons depuis nos débuts universitaires et grâce à elle j'ai rencontré la femme de

ma vie. Merci à Sébastien, mon capitaine, toujours présents malgré vents et tempêtes. Vous m'avez tous connu avec mes hauts et mes bas et vous me supportez toujours, c'est en soit un accomplissement.

Enfin je voudrais remercier ma famille qui me soutien depuis le début. Particulièrement mes parents qui se sont sacrifiés pour m'offrir la vie que j'ai aujourd'hui. Je n'ai jamais manqué de rien grâce à eux et j'ai toujours eu la chance de trouver en eux le pilier que j'avais besoin pendant les moments les plus difficile. Je leur dédie cette thèse et le travail que j'ai fourni. J'espère qu'ils seront fiers de moi et de qui je suis devenu. Pour tout ceci et plus encore, je vous remercie et je vous aime.

Pour finir, je remercie ma femme qui m'a accompagnée tout au long de cette thèse. Nous nous avons partagé cette épreuve, sciences dures et sciences humaines, et nous sommes arrivé jusqu'au bout. Tu m'as offert ton amour et ta confiance et je ne l'oublierai jamais. Une pensée également pour notre chien Okami, il ne parle pas beaucoup mais a changé ma vision du monde. Le meilleur choix que nous ayons fait.

Pour finir je remercie les animaux qui ont donné leur vie dans mes expériences, et ceux qui continueront à la donner pour les années à venir. Sans leur sacrifice notre travail ne serait pas possible.

Novosibirsk, Sibérie

Résumé

Le *binge drinking* (BD) est un mode de consommation d'alcool très répandu chez les jeunes adultes et qui se caractérise par une prise massive et épisodique d'alcool dans un laps de temps court afin d'atteindre rapidement l'état d'ivresse. Chez ces jeunes, le *BD* est responsable de perturbations des capacités cognitives et la consommation des femmes rattrape celle des hommes alors qu'elles seraient plus sensibles aux effets délétères de l'éthanol (EtOH) sur le cerveau. Dans ce contexte, il nous est apparu important de comprendre les différences liées au sexe dans les effets du *BD* sur le fonctionnement cérébral, et notamment la plasticité neuronale de l'hippocampe, mécanisme cellulaire de la mémoire et des apprentissages. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été i) d'explorer l'impact du cycle ovarien sur les effets du *BD* sur la plasticité neuronale de l'hippocampe, ii) de mesurer la modulation des effets de l'éthanol par les œstrogènes pendant l'adolescence chez la femelle et chez le mâle, et iii) de chercher les mécanismes d'action impliqués. Ainsi, nous avons enregistré chez la ratte adolescente la plasticité du réseau hippocampique *ex vivo* après une exposition courte à l'éthanol après 2 binges d'éthanol. Nous avons mis en évidence une abolition de la plasticité de type dépression à long terme (LTD) à 24h de délai, seulement lorsque l'administration d'éthanol était effectuée pendant le pic d'œstrogènes endogènes, suggérant une interaction entre éthanol et œstrogènes (E2). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré chez des rattes pubères, prépubères, et chez des mâles adolescents les effets sur la DLT d'un traitement exogène d'E2+EtOH. L'abolition de la DLT a été observé à chaque fois. L'utilisation d'antagonistes spécifiques nous a permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs aux œstrogènes, ainsi que de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA dans ces résultats. Nous concluons que les œstrogènes pourrait être un facteur de vulnérabilité liés au genre vis-à-vis des effets de l'alcool sur les capacités cognitives chez les femelles, pendant l'adolescence.

Mots-clés : alcool, plasticité synaptique, *binge drinking*, hippocampe, adolescence, œstrogène

Abstract

Binge drinking (BD) is a kind of alcohol consumption mostly appreciated by young people and defined by an episodic and huge alcohol intake in a short period of time in order to reach drunkenness. Within young people populations, BD is responsible of cognitive impairments, and the gender gap regarding alcohol consumption is now closed while women may be more sensitive to the deleterious effects of ethanol (EtOH) on the brain. In this context, it appears important to understand the sex-difference effects of binge drinking on brain function, especially the neuronal plasticity of the hippocampus which is the cellular mechanism of memory and learning. Thereby, the main goals of my thesis work were i) to investigate the importance of the estrus cycle on the effect of a short BD exposition on the hippocampal network plasticity, ii) to measure the estrogens-induced modulation of ethanol effects during adolescence period in female and male rats, and iii) to explore action mechanisms that might be involved. Thus, we recorded in adolescent female rats the plasticity of hippocampus slices after a short BD exposition. We have shown a Long-Term Depression (LTD) plasticity abolition 24h after the first ethanol injection, only when ethanol was injected during the endogenous peak of estrogens, suggesting an interaction between those two molecules. Then, we verified the hypothesis of an E2-EtOH interaction in post-pubescent, pre-pubescent female rats as well as in pubescent male rats after a treatment of exogenous E2 and EtOH. LTD abolition was found in every group. We used specific antagonists to highlight the implication of estrogens receptors and NMDA receptor GluN2B subunit in those results. We concluded that estrogens might be a gender driven vulnerability factor regarding alcohol effects on cognitive function during adolescence.

Key words : *alcohol, synaptic plasticity, binge drinking, hippocampus, adolescent, estrogen*

Liste des travaux et publications :

Articles – Revues internationales à comité de lecture

Publié

Silvestre De Ferron, Benoit Silvestre ; Bennouar, Khaled Ezaheir ; Kervern, Myriam ; Alaux-Cantin, Stéphanie ; Robert, Alexandre ; **Rabiant, Kevin** ; Antol, Johann ; Naassila, Mickaël ; Pierrefiche, Olivier. Two *binge*s of ethanol a day keeps the memory away in adolescent rats. 2015, *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. IntJNP-14-0489

Peineau Stéphane, **Rabiant Kevin**, Pierrefiche Olivier, Potier Brigitte. Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: Involvement in Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. 2018;130:385-401. doi:10.1016/j.phrs.2018.01.018

En révision:

K. Rabiant, J. Antol, M. Naassila and O. Pierrefiche. Sex difference in the vulnerability to hippocampus plasticity impairment after *binge*-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key? ACER, Oct 2020

C. Bertrand, C. Deschamps, **K. Rabiant**, S. Peineau, M. Naassila, C. Vilpoux and O.Pierrefiche. Patch-clamp recording of LFS-induced long-term synaptic depression in rat hippocampus slices during early and late periods of neurodevelopment. Addiction Biology, Oct 2020

Communications orales:

Réseau LARC-Neurosciences, octobre 2018, Rouen

K. Rabiant, J. Antol, M. Naassila and O. Pierrefiche

Estrogen level is responsible for sex-dependent alteration of synaptic plasticity induced by *binge drinking* in adolescent rats.

Journée Amiénoise de la Recherche en Santé, janvier 2019, Amiens

K. Rabiant, J. Antol, S. Peineau, M. Naassila and O. Pierrefiche

Les taux élevés d'oestrogènes sont associés à des atteintes de la plasticité synaptique induites par le *binge drinking*.

Prix oral

Communications affichées :

SFR-Cap santé, mars 2017, Reims

K. Rabiant, B. Silvestre de Ferron, K-E. Bennouar, M. Kervern, S. Alaux-Cantin, A. Robert, M. Naassila, O. Pierrefiche. *Différences mâle/femelle des atteintes de plasticité synaptique dans l'hippocampe après exposition de type binge-drinking*

Prix poster

Réseau LARC-Neurosciences, octobre 2017, Lille

K. Rabiant, T. Lhomme, R. Alari, A. Robert, J. Antol, M. Naassila, O. Pierrefiche. *Gender difference in synaptic plasticity alteration induced by binge-drinking in adolescent rats.*

Gordon Research Conference "Alcohol and the Nervous System", mars 2018, Galveston Texas

K. Rabiant, T. Lhomme, R. Alari, A. Robert, J. Antol, M. Naassila, O. Pierrefiche. *Synaptic plasticity alteration induced by binge drinking : a gender difference in adolescent rats.*

ESBRA, octobre 2019, Lille

K. Rabiant, C. Marie, J. Antol, M. Naassila, O. Pierrefiche. *Implication of estrogen in synaptic plasticity alteration induced by binge drinking in adolescent rats.* Publié dans Alcoologie et Addictologie, Septembre-Décembre 2019, tome 41, n°3-4, p395

Liste des formations et activités d'enseignement

Formations :

Formation à la médiation scientifique et diffusion des connaissances, Paris, 2017 (8h)

Formation à l'expérimentation animale niveau concepteur, Centre universitaire de Recherche en Santé, Amiens, 2017 (30h).

Formation en lien avec l'activité d'enseignement (contrat doctoral élargi), Service Universitaire de Pédagogie, Amiens 2018. (7,5 jours)

Stage de Pédagogie Lycée-Université sous la direction de Mme Noël, Paul Langevin, Beauvais, 2018. (1 semaine)

Charges d'enseignement :

- Travaux pratiques de Communication et Signalisation Cellulaire, 2ème année de Licence SVT (60h)
- Travaux pratiques de Neuroanatomie Fonctionnelle, 2ème année de Licence SVT (36h)
- Travaux dirigés sur l'Orexine – Organe des sens – Somesthésie), 2ème année de Licence SVT (4h)

Table des matières

Résumé étendu 26

Chapitre 1 : Contexte scientifique 32

Alcool et Santé 34

1. Petite histoire de la consommation d'alcool: 34
2. L'alcool en France, sa place et sa consommation 38
   2.1 Représentation de l'alcool en France 38
   2.2 Épidémiologie de la consommation d'alcool en France 40

Le *Binge Drinking* 44

1. Définition du *Binge Drinking* 44
2. Épidémiologie du *Binge Drinking* en France 46
3. Conséquence du *Binge Drinking* à court et moyen terme 48
4. *Binge Drinking*, adolescence et différences liées au genre 50

L'hippocampe 64

1. Rappels anatomiques concernant l'hippocampe : 65
   1.1 Organisation cytoarchitecturale : 65
   1.2 La circuiterie intra-hippocampique : 67
   1.3 Connexions efférentes : 68

1.4 Connexions afférentes : 70
2. Hippocampe et mémoire : 70
3. Plasticité synaptique 73
3.1 Concept de la plasticité synaptique :..... 73
3.2 La potentialisation à long terme 79
3.3 La dépression à long terme 84
3.4 Éthanol, mémoire, plasticité et adolescence..... 94

Les œstrogènes 102

1. Rappel sur la découverte du principe de sécrétion hormonale 102
2. Généralités sur les œstrogènes..... 104
2.1 La synthèse œstrogénique 104
2.2 Le cycle œstral 106
2.3 Les récepteurs aux œstrogènes 110
2.4 Répartitions et fonctions des récepteurs ERα et ERβ 112
3. Œstrogènes, mémoire et apprentissage 116
4. Œstrogènes et plasticité fonctionnelle..... 120
4.1 La plasticité à 2 étapes ou la théorie du « *two-step wiring plasticity* »120
4.2 Œstrogènes et Potentialisation à Long Terme 121
4.3 Œstrogènes et Dépression à Long Terme 123
4.4 Œstrogènes, plasticité structurelle et excitabilité synaptique 125
5. Différences mâle/femelle..... 130
6. Interactions œstrogènes et éthanol 137

Questions Scientifiques 142

Chapitre 2 : Matériels et méthodes..... 146

1. Animaux 148
2. Agents Pharmacologiques 148
3. Détermination du cycle ovarien 149
4. Alcoolisation de type « *Binge-Drinking* » 150
5. Électrophysiologie 153
5.1 Préparation des tranches d'hippocampe 153
5.2 Enregistrements des potentiels de champs 154
5.3 Protocoles expérimentaux 155
5.4 Mesures des signaux électrophysiologiques, analyses et statistiques 157

Chapitre 3 : Résultats 160

Différence liée au sexe dans la vulnérabilité de la plasticité de l'hippocampe après une exposition à l'éthanol de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Implication de l'œstrogène 162

Publication de thèse 166

Chapitre 4 : Discussion et Perspectives 202

Différence mâles/femelles sur l'altération de la plasticité hippocampique induite par le *binge drinking* 204
1. Considérations techniques 204
2. *Binge*, œstrogènes et plasticité 206
3. Perspectives 219
4 Conclusion générale 230

Chapitre 5 : Autres travaux réalisés pendant ma thèse 232

Plasticité et Alcoolodépendance chez les rats adultes..... 234

Maladie d'Alzheimer et modulation de la plasticité synaptique par les peptides circulants 238

Enregistrement de la DLT de l'hippocampe de rat durant différentes périodes de l'adolescence avec la technique de patch-clamp..... 280

Bibliographie 318

Table des illustrations

***Figure 1**: Peinture murale du tombeau de Nakht le "scribe d'Amon". _____ 35*

***Figure 2**: Graphique représentant le pourcentage de Français consommant de l'alcool quotidiennement ou pratiquant au moins une API en fonction de l'âge. _____ 47*

***Figure 3**: Représentation schématique du système limbique et de sa disposition spatiale dans le cerveau humain. _____ 64*

***Figure 4**: Représentation schématique des couches cellulaires des Cornes d'Ammon de l'hippocampe _____ 67*

***Figure 5**: Représentation graphique de la circuiterie synaptique d'une tranche coronale d'hippocampe dorsal de rat illustrant la transmission trisynaptique. _____ 68*

***Figure 6**: Représentation graphique du circuit de Papez. _____ 69*

***Figure 7**: Catégorisation des différentes mémoires à long terme _____ 72*

***Figure 8**: Résultats de l'expérience de Bliss et Lomo dans leur article de 1973 _____ 80*

***Figure 9**: Représentation simplifiée des voies de signalisation se déroulant pendant l'induction et le maintien de la PLT. _____ 83*

***Figure 10**: Dépression à long terme (DLT) dans l'hippocampe issu de l'article de Mulkey et Malenka en 1992. _____ 86*

***Figure 11**: Représentation schématique de l'implication de GluA1 dans le maintien de la DLT. _____ 89*

***Figure 12**: Représentation schématique de l'implication de GluA2 dans le maintien de la DLT. _____ 92*

***Figure 13**: Représentation d'un test de Reconnaissance du Nouvel Objet (NOR). _____ 96*

***Figure 14**: Formules semi-développée des différentes molécules d'œstrogènes._____ 104*

***Figure 15**: Représentation schématique des taux d'hormones pendant le cycle ovarien. __ 107*

***Figure 16**: Taux d'estradiol (pg/mL) dans le sérum chez des femelles rats F344 pendant les différentes phases du cycle œstral._____ 108*

***Figure 17**: Comparaison du cycle de l'œstrus chez le rat et du cycle ovarien chez la femme. _____ 109*

***Figure 18**: Représentation schématique des domaines constituants les récepteurs aux œstrogènes α et β _____ 111*

***Figure 19**: Exemple de stratégie utilisée lors d'un apprentissage spatial en fonction du sexe. _____ 133*

***Figure 20**: Résultat de l'analyse de la croissance des classes latentes basées sur 15 critères montrant la proportion de black-out en fonction de l'âge._____ 138*

***Figure 21**: Photographie présentant les différentes phases du cycle œstral avec la différenciation cellulaire._____ 150*

***Figure 22**: Représentation schématique du déroulement des protocoles expérimentaux. _ 152*

***Figure 23**: Représentation schématique de l'installation des électrodes en fonction des protocoles expérimentaux (enregistrement somatique ou dendritique) au niveau d'une tranche dorsale d'hippocampe._____ 156*

***Figure 24**: Apparition de la puberté chez le rat en fonction du sexe. _____ 205*

***Figure 25**: Représentation graphique des éthanolémies de rats mâles et femelles en fonction de l'âge et de la dose injectée. _____ 212*

***Figure 26**: Représentation de la théorie BCM représentant les changements de métaplasticité de l'hippocampe pouvant être induite par l'injection d'éthanol et d'estradiol. _____ 218*

***Figure 27**: Représensation schématique de la régulation hormonale chez les femmes naturellement cyclées _____ 224*

***Figure 28**: Représentation schématique des connexions du circuit de la récompense dans un cerveau de rat._____ 229*

***Tableau 1**: Résumé de la méthodologie et des effets observés sur les études cliniques portant sur le binge drinking 57*

***Tableau 2**: Liste non exhaustive des études récentes s'intéressant aux effets des E2 sur l'hippocampe. 128*

***Tableau 3**: Différences liées au genre dans les effets de l'E2. ..... 136*

***Tableau 4**: Liste et concentration des différents éléments constituant la solution de coupe et le liquide cérébro-spinal artificiel (LCSa) normal et à faible Mg2+ (en mM). 154*

Résumé étendu

Notre étude avait pour but la meilleure compréhension des effets d'une alcoolisation ponctuelle importante (API), sur la plasticité de l'hippocampe, organe clé des mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage, ainsi que la mise en évidence d'une différence du genre dans les effets délétères d'une telle consommation. Notre précédente étude avait montré une atteinte de la Dépression à Long-Terme (DLT), type de plasticité nécessaire à la mémorisation, chez des rats mâles adolescents à la suite d'un protocole d'API. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact que pouvait avoir les œstrogènes, principales hormones sexuelles féminines, sur les effets que l'éthanol pouvait avoir sur la plasticité de type DLT chez des femelles adolescentes.

Une API, ou *binge drinking* par son terme anglo-saxon, se définit comme la consommation d'une importante quantité d'alcool dans un espace de temps court, de manière ponctuelle et épisodique, avec pour objectif d'atteindre rapidement l'état d'ébriété. C'est à notre époque le mode d'alcoolisation le plus populaire chez les adolescents et les jeunes adultes. De nombreuses études ont déjà montré les effets néfastes de ce type de consommation lors d'une répétition chronique avec de graves répercussions sur les capacités cognitives des individus. Le cerveau n'atteignant sa maturation que vers les 25 ans, les adolescents et jeunes adultes qui pratiquent le *binge drinking* présentent donc un cerveau plus susceptible aux effets délétères de l'éthanol. La communauté scientifique s'est intéressée aux effets à long-terme de ce type de consommation sur la mémoire mais assez peu sur les effets qu'un faible

nombre d'API peut avoir sur les capacités cognitives. La mise en place de mécanismes d'adaptation pathologique du cerveau pouvant survenir très tôt dans la consommation d'éthanol, il apparait important d'étudier et de comprendre les effets précoces que le *binge drinking* peut induire sur la plasticité cérébrale. Pour étudier les répercussions d'une exposition courte au *binge drinking* sur la mémoire, notre laboratoire a étudié chez des rats mâles adolescents la plasticité de l'hippocampe après un faible nombre d'exposition à l'éthanol. Cette première étude nous a permis de mettre en évidence une perturbation de la mémorisation chez des rats males adolescents après seulement 2 intoxications de type *binge drinking*, accompagnée par une atteinte sélective et dramatique de la DLT hippocampique puisque nous la retrouvons abolit 48h après l'exposition à l'éthanol. Cependant, la mise en évidence d'une différence liée au genre sur ce type d'atteinte n'est pas connue, et la différence dans la sensibilité des sexes vis-à-vis de ce type de consommation n'a été que peu étudié. Aujourd'hui, l'écart de consommation entre les hommes et les femmes s'est considérablement réduit, surtout chez les adolescents et jeunes adultes. Le *binge drinking* touche donc les deux sexes et il apparait important de s'intéresser aux effets de l'éthanol également chez les jeunes femmes, surtout pendant l'adolescence qui voit apparaître, par le biais du cycle menstruel, de nouvelles molécules neuro-effectives : les œstrogènes.

Les effets de l'éthanol sur le cerveau sont différents en fonction de la quantité d'alcool ingérée, du type de consommation et du stade de maturation cérébrale. Concernant l'hippocampe, il a été montré que des atteintes de la transmission glutamatergique, principalement sur les récepteurs NMDA, peuvent avoir des répercussions sur les capacités de plasticité de cette structure. D'un autre côté, les œstrogènes peuvent avoir un effet excitateur des neurones de l'hippocampe par le biais de ses récepteurs ERα et ERß. Toutefois, et à notre connaissance, peu d'études ont été menées sur les effets d'une interaction potentielle entre l'éthanol et les œstrogènes et sur l'implication que peut avoir une telle interaction sur des atteintes de la plasticité neuronale et par extension, sur les capacités de mémorisation et d'apprentissage des hommes comparativement aux femmes.

En partant de ce constat, le but de notre étude a été de mettre en évidence i) une différence liée au sexe dans les effets précoces d'un faible nombre de *binge drinking* sur la plasticité de l'hippocampe de rats femelles adolescentes, ii) l'implication des œstrogènes et

iii) les mécanismes d'actions potentiels responsables de cette différence. Pour répondre à cette question, nous avons séparé les femelles adolescentes en fonction de leur phase du cycle ovarien au moment de l'injection d'éthanol et utilisé une injection d'œstrogène exogène (le 17β-estradiol) pour mimer le pic endogène chez des femelles pubères, mais également prépubères et adultes afin d'en étudier les différences. Nous avons ensuite comparé ces résultats avec ceux obtenus chez les mâles et étudier les effets de l'estradiol chez les mâles. Enfin, une approche pharmacologique nous a permis d'étudier les mécanismes d'actions sous-jacents.

Dans l'article issus de ces travaux, les rattes ont été étudiées pendant 3 périodes de leur vie : la période prépubère (25-30 jours), la période pubère (35-45 jours) et la période adulte (200-250 jours). Les femelles ont reçu 2 injections intrapéritonéales d'éthanol 20% (3 g/kg, v/v) ou de solution physiologique sur une journée, à 9 heures d'intervalle. En fonction de la question scientifique étudiée, les femelles pouvaient également recevoir une seule injection i.p. d'estradiol (17β-estradiol à la dose de 180 µg/kg, en solution dans de l'huile de sésame) quelques minutes avant la première injection d'éthanol pour mimer un pic d'œstrogènes endogènes. Les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués 24h ou 48h après la première injection. Nos résultats ont permis de mettre en évidence une abolition de la DLT chez les femelles pubères 24h après l'exposition à l'alcool seulement lorsque l'éthanol était injecté pendant le pic endogène d'œstrogènes, c'est-à-dire, pendant la phase du cycle œstral appelée prœstrus. Ce résultat est très intéressant car il est différent de celui que nous avions mis en évidence lors de notre précédente étude puisqu'à cette dose, les mâles du même âge ne présentaient aucune altération de leur plasticité de type DLT. Afin de s'assurer de cette abolition précoce de la DLT chez les femelles par rapport aux mâles, nous avons cherché à la reproduire en injectant de l'estradiol exogène quelques minutes après l'éthanol chez des femelles pubères pendant une phase de cycle œstral caractérisée par un faible taux d'œstrogènes circulant, mais également chez des femelles prépubères et des mâles adolescents qui ne présentent pas de production importante d'œstrogènes endogènes. Nous avons ainsi pu obtenir une abolition de la DLT lorsque l'estradiol était injecté de manière concomitante avec l'éthanol dans ces différents modèles animaux. La répétabilité de ce résultat dans divers contextes expérimentaux indique sa robustesse et nous permet d'émettre

l'hypothèse qu'une interaction entre les 2 molécules pourrait être responsable de cette abolition. De la même manière, 24h après l'injection d'estradiol concomitante à celle d'éthanol, la DLT des rats mâles pubères est abolie, soit plus tôt qu'en absence d'estradiol, renforçant une nouvelle fois notre hypothèse.

Dans un second temps, l'abolition précoce de la DLT chez les femelles par rapport aux mâles indiquait une éventuelle différence de sensibilité de la plasticité hippocampique des femelles vis-à-vis de l'éthanol. Différence de sensibilité qui pourrait corroborer les résultats des études cliniques qui indiquent des perturbations mnésiques chez les jeunes femmes *bingers* plus importantes que chez les jeunes hommes pratiquant le *binge*. Nous avons donc voulu mettre en évidence une différence de sensibilité liée au genre. Pour se faire nous avons augmenté la dose d'éthanol injectée à 3,75g/kg en i.p. à des rats mâles et nous avons mesuré une abolition de la DLT dès 24h après traitement. Ce résultat est intéressant puisqu'il souligne une différence de sensibilité entre les sexes pouvant être attribuée à la présence des œstrogènes chez les femelles. Néanmoins, chez les femelles adultes (200-250 jours), ni la phase du cycle ovarien, ni l'injection d'éthanol, ni l'injection d'estradiol n'altèrent la plasticité de type DLT 24h ou 48h après le traitement. Ce résultat supporte l'hypothèse d'une sensibilité accrue aux effets de l'éthanol et des œstrogènes chez le modèle adolescent.

Concernant les mécanismes d'actions de cette interaction, nous nous sommes penchés sur la voie des récepteurs NMDA et plus particulièrement de sa sous-unité GluN2B dont nous connaissions son implication dans l'altération de la DLT chez le rat mâle adolescent après un traitement similaire à l'éthanol. Pour tester l'éventuelle implication de la sous-unité GluN2B chez les femelles lors de l'abolition précoce de la DLT, nous avons utilisé un antagoniste spécifique de cette sous-unité, le Ro25-6981 qui, lorsqu'appliqué dans le bain d'enregistrement, altérait les potentiels post-synaptique excitateurs (PPSE) des récepteurs NMDA de manière plus importante chez les rattes traitées à l'estradiol et à l'éthanol, indiquant une modification à la hausse de l'activation de la sous-unité GluN2B dans les conditions où ces deux molécules sont présentes en même temps. D'un autre côté, et parce que les œstrogènes sont connus pour activer des récepteurs propres ERα et ERβ, nous avons étudié l'implication des récepteurs aux œstrogènes (ERs) en utilisant le tamoxifène, un antagoniste des ERs, injecté en i.p. à la suite de l'estradiol et de l'éthanol, ou de l'estradiol seul. Nous avons ainsi mis en évidence une prévention partielle de l'abolition de la DLT 24h après l'injection d'éthanol, d'estradiol et de tamoxifène illustrant ainsi une implication des ERs dans l'abolition

de la DLT. Notre étude permet de mettre en évidence les effets modulateurs des œstrogènes sur les atteintes de la plasticité de l'hippocampe induites par l'éthanol, et ce, dès les premières prises massives d'alcool. L'utilisation des antagonistes suggèrent que les œstrogènes, en agissant sur les ERs, module l'expression de la sous-unité GluN2B, comme pourrait le faire l'éthanol. Cette accumulation de ces deux effets pourraient causer une augmentation de la présence et de l'activité des récepteurs NMDA à la surface de l'élément postsynaptique ce qui entrainerait une augmentation de l'entrée de Ca^{2+}, aboutissant à l'abolition de la DLT. Cette abolition de la DLT pourrait être une cause ou une conséquence des atteintes mnésiques que nous avions précédemment enregistrées chez le mâle adolescent dans un test comportemental de reconnaissance d'objet et que nous retrouvons dans la littérature chez les mâles et les femelles exposées aux œstrogènes et à l'éthanol dans des tests de peur contextuelle conditionnée. Pris dans leur ensemble, ces résultats témoignent d'une différence liée au sexe dans les effets de l'éthanol sur la plasticité de l'hippocampe chez les rats adolescents pouvant être causée par la présence d'œstrogènes chez les femelles. De plus, ces résultats soulignent l'intérêt de prendre en compte les hormones sexuelles dans l'étude des effets de l'éthanol sur les capacités mnésiques des adolescentes, période pendant laquelle se croisent prise massive d'alcool et charge hormonale importante, qu'elle soit naturelle ou pharmacologique avec la prise de pilules contraceptives.

Dans ce manuscrit, nous allons, dans un premier chapitre « Contexte scientifique », abordé le *binge drinking* et l'état de consommation d'alcool en France. Puis nous nous intéresserons à l'hippocampe, structure clé de la mémoire et de l'apprentissage, en portant une attention particulière à la plasticité synaptique, principalement la dépression à long terme. Nous finirons ce chapitre sur les œstrogènes, passant sur ses généralités jusqu'à son implication dans la mémoire, les différences liées au genre et son interaction avec l'éthanol. Dans un deuxième chapitre, nous présenterons notre méthodologie puis le troisième chapitre sera axé sur nos résultats obtenus lors de notre étude scientifique. Enfin, nous conclurons sur nos travaux et offrirons des perspectives permettant de prolonger nos hypothèses dans un quatrièmement chapitre. Nous terminerons avec les résultats annexes obtenus au cours de cette thèse qui vous serons présentés succinctement.

Chapitre 1 : Contexte scientifique

Alcool et Santé

1. Petite histoire de la consommation d'alcool:

L'alcool est le produit d'une fermentation de produits alimentaires tels que les céréales, le miel ou encore les fruits, en éthanol (dont la formule chimique est CH_3CH_2OH). Cette molécule est une substance psychoactive qui a traversé les âges et que l'on retrouve aujourd'hui sur nos tables sous la forme de boissons alcoolisées. La fermentation alcoolique qui aboutit à l'éthanol, aussi appelé alcool éthylique, est un processus anaérobie qui permet la transformation de sucres en éthanol dans des conditions particulières et sous l'effet de ferments micro-organiques tels que les levures. Par extension, le mot « alcool » désigne toute boisson contenant la molécule « éthanol ». L'alcool au sens commun du terme ou les alcools au sens de produits consommables se catégorisent selon les ingrédients ou le procédé de fabrication utilisé. On distingue donc, et de manière non exhaustive, les vins, les spiritueux, les bières, les cidres, les eaux de vie, les liqueurs, les élixirs,… etc.

La consommation d'éthanol sous forme de boissons alcoolisées ne date pas de l'ère moderne de l'humanité. En effet, on trouve des traces de consommation d'alcool au néolithique autour du XX^{ème} siècle avant J.-C. En 2018, une étude archéologique dans la caverne de Raqefet, au sud de Haïfa dans le nord d'Israël, a mis en évidence ce qui est considéré comme l'un des plus anciens sites de production d'une boisson fermentée proche de la bière avec l'utilisation d'outils de stockage et de fermentation (Liu *et al.*, 2018). On retrouve également des traces d'utilisation d'alcool dans des résidus organiques à l'intérieur de poteries ayant été utilisées dans la fermentation de la bière ou son stockage en Chine antique, vers 7000 ans avant J.-C.. À cette époque, l'alcool était utilisé dans des contextes sociaux, religieux et médicaux (McGovern *et al.*, 2004). La première apparition de l'alcool comme boisson manufacturée remonte à 4000 ans avant J.-C., en Mésopotamie, où les

Sumériens fabriquaient de la bière (Michel, McGovern and Badler, 1992). Par la suite, l'alcool et sa fabrication apparaissent dans de nombreux écrits. D'abord en Égypte où des papyrus décrivent les processus de fabrication, de production et de commercialisation de la bière (*heneqet*) et du vin (Figure 1), et de manière intéressante, les premières mises en garde contre l'ivresse et ses conséquences physiques, comme les vomissements et les pertes de consciences, mais également sociales, avec une stigmatisation des individus abusant de l'alcool. Les jeunes égyptiens devaient donc associer l'alcool avec un évènement festif tout en respectant les règles de savoir-vivre imposées par la société (Vernus, 2001, p381-382) C'est également à cette période que la consommation d'alcool renvoie à la religion avec Osiris, dieu de la mort mais également seigneur du vin lors de la fête des morts. Il était organisé pour lui de grandes fêtes alcoolisées et d'après les *Textes des Pyramides* (les plus anciens écrits religieux connus à ce jour) le vin est nécessaire aux sacrifices funéraires et constituaient la boisson principale des pharaons dans l'après-vie (Mu-Chou Poo, p25-26).

Figure 1: Peinture murale du tombeau de Nakht le "scribe d'Amon".

Représente 2 paysans pratiquant la vendange pendant que d'autres foulent le raisin aux pieds. Le moût est stocké dans des jarres. Partie basse de la paroi nord-ouest du tombeau

D'après Davies 1917, pl. 26

Dans l'ancien testament, on retrouve également cette référence à l'alcool, notamment avec Noé qui dans la Genèse est présenté comme le premier planteur de vigne (Genèse 9.20-21 « *Et Noé commença à être cultivateur et il a planté une vigne ; et il but du vin, et il s'enivra […]* »). On retrouve d'ailleurs dans la Bible plus de 500 citations sur le vin comme « *sang des raisins* » (la Genèse 49.11) ou encore « *sang de la grappe* » (le Deutéronome 32.12). Plus tard, on retrouve ce rapport au divin chez les Grecs avec Dionysos (dieu de la vigne, du vin et de ses excès), chez les Romains avec Bacchus, pour qui l'on organisait de grandes fêtes. Mais là encore, la consommation d'alcool était soumise à des règles sociales strictes car boire beaucoup était mal vu même si la fin de la conquête de l'Italie par l'Empire Romain (200 avant J.-C.) marque le début d'une valorisation des excès de consommation et avec elle l'apparition du premier jeu de boisson qui consistait à lancer un dé et à boire le nombre de verres indiqué par le résultat, ce qui devait rapidement aboutir à un état d'ébriété. Par la suite, le nouveau Testament donnera une nouvelle image du vin qui devient source de miracles lors des noces de Cana, mais également source de vie lorsque le vin devient le sang du Christ. Avec la chute de l'Empire Romain et la montée du christianisme, apparait le « culte de la vigne ». Les monastères sont les principaux producteurs et vecteurs de propagation de bières et de vins. Au Moyen Âge, malgré les répressions parfois violentes de l'Église concernant les abus d'alcool, sa consommation globale reste très répandue, si bien que les boissons alcoolisées remplacent facilement l'eau potable d'autant plus que celle-ci reste de mauvaise qualité. On trouve donc ici clairement un rôle hygiéniste de l'alcool comme médicament contre l'eau impropre à la consommation. Jusqu'à la fin du XV^{e} siècle, on reconnait à l'alcool des propriétés curatives si bien que l'alcool distillé était synonyme de remède vendu uniquement chez les apothicaires. C'est au XVIe siècle que le mot « alcool » est introduit dans son orthographe actuelle dans notre langue. Il vient du mot arabe « Al Khol » qui apparait en langue romane en 1278 et qui se traduit par « ce qui est très subtil », traduisant une nouvelle fois la dimension bénéfique et positive du breuvage. Avec l'apparition des boissons chaudes telles que le café, le thé et le cacao, ainsi que l'amélioration de la qualité de l'eau, la consommation d'alcool devient moins répandue au XVII^{e} siècle. C'est un siècle plus tard, avec le développement de nouvelles techniques de distillation et d'agriculture, que les spiritueux, boissons à haut titre alcoométrique, deviennent monnaie courante. Pendant cette période (début de la révolution industrielle - fin XVIII^{e}), les populations les plus exposées à la précarité, notamment les familles ouvrières, ont de plus en plus recours à l'alcool. Dans ce contexte, la consommation d'alcool

peut être comprise comme une automédication dans certaines populations afin de supporter des conditions de vie difficiles. La première appellation « d'alcoolisme chronique » fut employée par un médecin suédois, Magnus Huss, en 1849, dans son ouvrage *Alcoholismus chronicus* publié en France en 1852. Dans son ouvrage, il y fait état des troubles mentaux et des dommages hépatiques liés à la consommation chronique d'alcool et il décrit les effets de l'alcool comme étant un lent empoisonnement du sang suivi d'un processus de lésion du système nerveux. Par la suite, des politiques répressives et des campagnes contre l'alcool se sont multipliées en France : loi du 13 février 1873 contre la répression de l'ivresse publique, interdiction de l'absinthe avant la guerre de 1914, obligation d'enseignement sur les dangers de l'alcool en 1895 et ce, malgré une valorisation de la consommation du vin en France avec la création de l'œnologie, véritable science du vin, par la population bourgeoise qui, certes, condamnait l'alcoolisme prolétaire mais qui élevait le vin et l'eau de vie à des produits du terroir, symboles du raffinement et de culture. Ainsi, à la fin du XIX^{e} siècle, l'ambigüité du produit dans la société apparait clairement avec des politiques à la fois d'encouragement, de valorisation marchande de l'alcool mais aussi des répressions et d'éducation aux dangers de sa consommation. Une ambigüité que l'on retrouve tout à fait à notre époque contemporaine. Jusqu'au milieu des années 1960, l'État ne parvient pas à stopper la croissance de la consommation malgré les efforts de Pierre Mendès France, alors président du Conseil des ministres français et ministre des Affaires étrangères, qui crée le Haut Comité d'étude et d'information sur l'alcoolisme en 1954. Ce comité va mettre en place une série de mesures visant à lutter contre l'alcoolisme en réduisant l'offre par la fermeture de débits de boissons, en développant les campagnes de prévention routières et scolaires, et en organisant des campagnes publicitaires anti-alcool. Dans ce contexte, on rappellera une des mesures phares de Pierre Mendès France qui sera d'interdire la distribution d'alcool dans les cantines scolaires en 1956 pour les enfants de moins de 14 ans. En effet, avant cette date, ils avaient droit à un demi-litre de vin, de cidre ou de bière pendant leur déjeuner. Il a fallu attendre la fin du XX^{e} siècle pour trouver des consommations plus hygiénistes avec l'arrivée des « cols blancs » buvant de l'eau sur leur lieu de travail et choisissant un vin de bonne qualité pour leurs invités, et ce, pas plus d'une fois par semaine. Cet état d'esprit fut accompagné de nouvelles règlementations visant à pénaliser l'abus d'alcool avec l'aggravation des peines pour conduite en état d'ivresse en 1985, et la mise en place de campagnes publicitaires dont certains slogans marqueront toute une génération, tel que « *un verre ça va, trois verres bonjour les dégâts* »

(Diffusé à partir du 16 février 1984). Ce n'est qu'en 1971 que l'on voit apparaître l'enseignement de l'alcoologie pour les étudiants de médecine, les professions paramédicales, les juristes et les travailleurs sociaux. Enfin, ce n'est qu'en 1981 avec Alain Savary, alors ministre de l'Éducation nationale, que les boissons alcooliques sont interdits des cantines scolaires même pour les 14 ans et plus. Il précisa que « *l'eau est la seule boisson hygiénique recommandable à table* ». Cependant, malgré les efforts des politiques pour réduire la consommation d'alcool, c'est 3 millions de décès dans le monde en 2016 qui sont attribuables à l'abus d'alcool selon le dernier rapport de 2018 de l'Organisation Mondiale de la Santé, soit plus de 5% (1 décès sur 20) de la charge de morbidité au niveau mondial dont plus des ¾ concernent des hommes. Ainsi, en 2017, en France, c'est 11,7 litres d'alcool pur qui sont consommés chaque année par habitant de plus de 15 ans (Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies - OFDT, 2017) chiffre qui, malgré une réduction constante depuis le début des années 1960, reste encore très élevé au regard des risques sanitaires encourus par les consommateurs.

2. L'alcool en France, sa place et sa consommation

2.1 Représentation de l'alcool en France

L'alcool à une place particulière en France. Profondément ancré dans notre histoire et dans notre culture, l'alcool est d'abord associé comme un consommable festif avant d'être considéré comme une drogue dangereuse. Soirée entre amis, grande occasion ou moment de détente après une journée de travail, toutes les situations sont bonnes pour consommer et cette habitude se remarque sur les chiffres de la filière économique liée à l'alcool en France. En effet, selon l'INSEE (l'Institut national de la statistique et des études économiques), les ménages français ont consacré en 2015 près de 20,7 milliards d'euros aux boissons alcoolisées, ce qui représentant 1,3% de leur budget total uniquement en achat de boissons alcoolisées (INSEE, 2017). L'importance de l'alcool est donc également économique puisqu'en 2013, la filière représentait près de 22 milliards d'euros de chiffre d'affaire, principalement issu de la viticulture (15 milliards). La France est le premier pays exportateur de vin, devant l'Italie (Cour

des comptes, 2016), ce qui rapporterait à l'État français environ 3,2 milliards d'euros (OFDT, 2018).

L'alcool, bien que toxique, est donc une substance appréciée par les Français, et cette facette nocive est souvent masquée par le côté social et convivial qui lui est attribué. Une étude sur la perception des produits en France, en 2018, a révélé que seulement 24% des individus interrogés (âgés de 18 à 75 ans) citaient spontanément l'alcool comme étant une drogue et ce, même si 66% d'entre eux adhèrent au fait que « *l'abus d'alcool pose plus de problème à la société que l'usage de drogue illicite* » (OFDT, 2019). À l'inverse des drogues illicites, l'alcool est rarement perçu comme dangereux à la première utilisation (10% des individus). Cependant, une majorité (79%) cite l'usage quotidien d'alcool comme principal facteur de dangerosité. Ce paradoxe dans la perception de l'alcool est bien entendu renforcé par la proximité avec ce produit puisque, contrairement au tabac, il ne souffre pas d'une limite de sa visibilité. En effet, 23% des participants à l'enquête se souviennent avoir vu ou entendu une publicité pour une boisson alcoolisée au cours de la dernière semaine (OFDT, 2019). Ainsi, et malgré la bonne conscience des effets délétères de la substance, l'alcool reste dans l'esprit collectif, associé à quelque chose de bon puisque 56% des individus considèrent qu'offrir ou boire de l'alcool fait partie des règles de savoir-vivre et que 45% des personnes considèrent qu'il est acceptable de boire son premier verre d'alcool avant 18 ans (OFDT, 2019).

Lorsqu'on parle de consommation d'alcool il faut prendre en considération les différents usages possibles. Ainsi cinq catégories d'usage chez l'adulte ont été définies dont deux ne présentant pas ou peu de risques pour le consommateur. L'ensemble des définitions des consommations est régulièrement mis à jour dans le *Manuel Diagnostique et Statistiques des troubles Mentaux* (DSM) dont l'édition la plus récente est la 5ème, publiée en 2013. La première catégorie d'usage est caractérisée par l'absence de consommation d'alcool. La seconde représente l'usage d'alcool qui ne dépasse pas le seuil de consommation recommandé par les organismes de santé. Même si le risque « 0 » n'existe pas avec l'alcool, ce type d'usage se caractérise par une consommation ponctuelle ou régulière mais qui n'induit pas de dommages au niveau somatique, psychoaffectif et/ou social. La consommation de la substance reste contrôlée en fonction du contexte dans lequel elle est consommée et l'usager ne présente pas de dépendance et peut également arrêter sa consommation lorsqu'il le désire. Pour une consommation « sans risque » selon Santé Publique France, il ne faut pas consommer plus de

10 verres d'alcool standard par semaine (un verre d'alcool standard, aussi appelé unité d'alcool standard représente la teneur en alcool pur d'une boisson alcoolisée proposée dans un débit de boisson qui est d'environ 10 g), pas plus de 2 verres standard par jour et avoir des jours d'abstinence dans la semaine, sans distinction de sexe (MILDeCA, 2019). L'OMS, quant à lui, recommande un maximum de 21 verres d'alcool pour un homme, 14 pour une femme, avec une limite à 4 verres par occasions en plus d'une journée d'abstinence dans la semaine. Concernant les catégories suivantes, il s'agit des usages à problèmes. Ils regroupent tout d'abord l'usage à risque définit par une consommation pouvant potentiellement provoquer des complications somatiques, psychoaffectifs et/ou sociaux, puis l'usage nocif (ou l'abus) qui est caractérisé par une consommation induisant au moins un dommage repérable (sur un plan somatique, psychoaffectif et/ou social) et enfin la dépendance qui se définit par la perte de contrôle de la consommation.

2.2 Épidémiologie de la consommation d'alcool en France

L'OFDT, au travers de ses enquêtes régulières, fournit une image claire des consommations des drogues sur le sol français. Il est ainsi rapporté qu'en France, c'est en moyenne 11,7L d'alcool pur par habitant âgé de plus de 15 ans qui ont été consommés en 2017, ce qui équivaut à environ 2,5 unités d'alcool consommées chaque jour par habitant. L'OFDT présente également des chiffres précis, permettant de mieux saisir les habitudes de consommation des français, et ce dès le plus jeune âge. Ainsi, l'enquête HBSC (Health Behaviour in School-Aged Children) réalisée tous les 4 ans depuis 1982 en partenariat avec l'OMS collecte des données dans 41 pays ou régions principalement européens concernant les habitudes et les historiques de consommation des élèves de 11 à 15 ans. La dernière enquête de 2014 révèle que la moitié des élèves de 6^{e} a déjà expérimenté l'alcool et ce chiffre monte à 80% en classe de 3^{e} avec une expérimentation plus précoce des garçons, expérimentation que les filles rattrapent en classe de 3^{e}. En 2017, l'enquête ESCAPAD (Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation À la Défense) portant sur les jeunes Français de 17 ans dévoile que 66,5% d'entre eux déclarent avoir bu au moins 1 fois le mois précédant l'enquête et 8,4% au moins 10 fois pendant cette même période. L'enquête révèle également que l'alcool est la drogue la plus consommée chez les jeunes de 17 ans et que les garçons montrent une consommation régulière plus importante

que les filles (12% vs 4,6%). Enfin, concernant les 18-75 ans, l'OFDT montre que 39% de la population présente une consommation hebdomadaire (63% pour les hommes vs 36% pour les femmes) et 10% de la population consomme quotidiennement de l'alcool (15% pour les hommes vs 5% pour les femmes) bien que la majorité concerne les plus de 50 ans. L'enquête précise que les femmes boivent de l'alcool régulièrement, mais en plus petite quantité que les hommes. Selon le Baromètre de Santé publique, 24% de la population française des 18-75 ans dépasse le seuil de consommation à faible risque soit un total de 10,6 millions de Français en 2017. Ainsi, en utilisant l'AUDIT-C (acronyme de *Alcohol Use Disorder Test*), un questionnaire de dépistage mis en place par l'OMS qui interroge la consommation, les symptômes de dépendance et les autres aspects d'une consommation excessive, il est possible d'avoir un aperçu des modes de consommation en France en fonction des profils des consommateurs. Quatre profils sont mis en avant, en prenant en compte les fréquences de consommation sur 12 mois, le volume d'alcool ingéré lors d'une prise d'alcool standard, ainsi que la fréquence des APIs (Alcoolisation Ponctuelle Importante), définis par l'OFDT comme étant la prise de 5 verres d'alcool standards pour un homme, et 4 verres pour une femme, en 2 heures lors d'une même occasion. En prenant ces informations en compte, en 2014, 37% des 18-75 ans étaient des buveurs sans risques ponctuels 11% des buveurs sans risques chroniques, 31% des buveurs à risque ponctuel et 8% des buveurs à risque chronique.

Les dommages sanitaires, sociaux et économiques liés à l'alcool sont importants. En France, 41 000 décès sont liés à l'alcool, soit 11% de la mortalité globale des hommes et 4% de la mortalité globale des femmes (Bonaldi and Hill, 2019). Dans le reste du monde, l'alcool est responsable de 3 millions de décès en 2016 selon l'OMS, ce qui est supérieur à d'autres maladies telles que le sida ou la tuberculose ou d'autres comportements sociaux comme les violences. Cela représente 5,3% des décès dans le monde et ce chiffre atteint 13,5% pour les jeunes (20-39 ans) (OMS, 2018). Il est intéressant de noter que trois quarts des décès concernent des hommes. D'un point de vue économique, l'alcool a un coût important puisqu'il est estimé par l'OFDT à 120 milliards d'euros par an en France, soit environ 1,3% du Produit Intérieur Brut national. Ainsi, malgré une image toujours positive dans la société, l'alcool et ses mésusages constituent un problème de santé publique majeur. D'autant plus que depuis quelques années, une nouvelle façon de consommer est arrivée en France, touchant principalement les adolescents et les jeunes adultes, que l'on appelle le *Binge Drinking*. Ce

mode de consommation caractérisé par une prise importante, massive et rapide d'alcool, a des répercussions sur la mémoire, ce qui constitue le thème des travaux de cette thèse.

Le *Binge Drinking*

1. Définition du *Binge Drinking*

À l'heure actuelle, il n'y a pas de définition précise du *Binge Drinking* (*BD*). Selon le pays ou les organismes de santé, les caractéristiques de ce mode de consommation peuvent varier. Néanmoins, on peut noter un consensus sur les points essentiels. Le premier point est de prendre en compte la quantité d'alcool consommée, le deuxième concerne la fréquence de consommation, et enfin le troisième fait référence à la durée pendant laquelle l'individu consomme. Cependant, il faut également prendre en compte le caractère épisodique de la prise d'alcool, marquée par la présence d'épisodes d'abstinence de durée variable entre les épisodes de consommation. Il est important de noter qu'en fonction des pays dans lequel on se trouve, le verre standard d'alcool peut ne pas être le même. Ainsi, et comme précisé précédemment, un verre standard d'alcool en France contient approximativement 10g d'alcool pur contrairement aux États-Unis où un verre standard représente approximativement 14g d'alcool pur et en Autriche où il correspond à 20g d'alcool pur. D'après Kalinowski et Humphreys (Kalinowski and Humphreys, 2016) la variation entre la teneur en alcool d'un verre standard peut atteindre 250%. Ils précisent également que les limites considérées comme étant à « bas risques » changent drastiquement, passant de 10g par jour au Portugal à 56g par jour (pour un homme) aux États-Unis. La définition officielle de l'OMS du *binge drinking* est le fait de boire plus de 60g d'alcool pur au cours de la même occasion au moins une fois dans le mois. D'un autre côté, le *NIAAA* (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism) aux USA, définit le *binge drinking* comme un type de consommation d'alcool qui amène le taux sanguin d'alcool à 0,08% ou plus, en une période

de 2 heures (Courtney and Polich, 2009). Contrairement à la définition standard de l'OMS, la définition du *NIAAA* introduit une notion de temps suggérant la recherche de l'état d'ivresse, ce qui se rapproche plus du style de consommation observé dans la population pratiquant le *binge drinking*. Ainsi, il a été mis en évidence qu'en fonction de la définition choisie (OMS vs *NIAAA*), les groupes de sujets inclus dans les études cliniques révélaient des profils de consommation et de sévérité des cas bien plus importants lorsque la définition de la *NIAAA* était prise en compte (Rolland *et al.*, 2017). Cette information est cruciale dans la démarche médicale et la prise en charge des patients. Ainsi, la fréquence de consommation de type *binge drinking* est importante à prendre en considération, car elle permet notamment de différencier les populations de *bingers* (fréquents vs non fréquents) d'autant plus que la fréquence est un facteur de risque dans le développement d'une addiction (Kuntsche *et al.*, 2017). Dans un second temps, la vitesse de consommation est un point essentiel. Il a été mis en évidence qu'une consommation rapide d'alcool entraine une éthanolémie importante et dangereuse pour la santé (Smith *et al.*, 2017). Cela s'explique par le fait que le foie ne peut prendre en charge qu'approximativement 1 verre d'alcool par heure, le reste restant dans la circulation sanguine. Enfin, les quantités d'alcool ingérées ne reflètent pas forcément la réalité et il a été mis en place de nouveaux paliers permettant de différencier les *bingers* des « *bingers extrêmes* » lorsque la prise d'alcool dépasse 112g d'alcool pur pour une femme et 140g pour un homme au cours de la même occasion (Hingson, Zha and White, 2017). Pour finir, et jusqu'à présent, le caractère psychologique des *bingers* n'est pas pris en compte dans la définition du *binge drinking*. Les différents critères précédemment cités mettent en exergue la nécessité d'une différenciation, d'une catégorisation des *bingers* en fonction de leur profil de consommation. Une étude récente de notre laboratoire met également en évidence le profil psychologique selon le modèle biopsychosocial de la personnalité de Cloninger. Ainsi, les *bingers* forment un groupe hétérogène et présenteraient au sein de sa population des profils appartenant au type I de Cloninger (principalement caractérisé par l'évitement du danger) mais également au type II de Cloninger (recherche de nouvelles sensations) que ce soit chez les hommes ou les femmes, même si ces dernières présentent également une consommation d'alcool plus fortement liée à l'anxiété (Gierski *et al.*, 2017a).

2. Épidémiologie du *Binge Drinking* en France

Le *binge drinking* est une pratique relativement récente dans notre culture. L'OFDT utilise l'appellation API et a commencé à organiser ses questionnaires, notamment pour mener l'enquête ESCAPAD concernant les jeunes de 17 ans, mais également les enquêtes du Baromètre santé en ajoutant la question « *Au cours des 30 derniers jours, combien de fois avez-vous bu au moins cinq verres en une seule occasion ?* ». Ainsi en 2017, 44% des jeunes âgés de 17 ans déclaraient avoir pratiqué une API au cours du mois précédant l'enquête, 16,4% déclaraient avoir pratiqué au moins 3 API le mois en cours et 2,7% plus de 10 le mois en cours. Point intéressant, parmi ces jeunes, seulement un quart d'entre eux déclarait ne pas avoir été ivre lors de leur dernière prise d'alcool, témoignant d'une réelle recherche de l'état d'ivresse. L'étude montrait également que la dernière consommation lors du mois précédant l'enquête s'était déroulée pendant le week-end dans 90,5% des cas et une fois sur deux pendant un évènement particulier (fête, anniversaire ou autre). Également, la consommation s'était faite entre amis (90,1%) mais chose plus surprenante, une bonne partie (29,8%) s'était faite en présence des parents. Ces chiffres corroborent l'image festive de l'alcool dans notre société mais également soulignent le poids social qui peut inciter les jeunes à consommer une plus grande quantité d'alcool pendant une soirée entre amis.

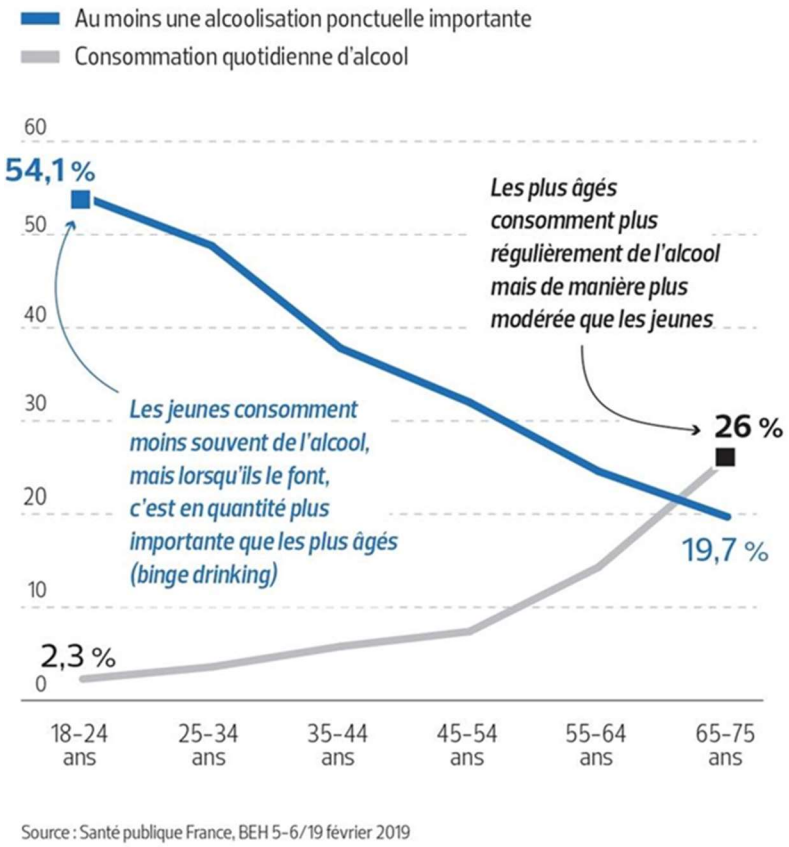


Figure 2: Graphique représentant le pourcentage de Français consommant de l'alcool quotidiennement ou pratiquant au moins une API en fonction de l'âge.

Santé Publique France, Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire –BEH - février 2019

Cependant, les jeunes ne sont pas les seuls à pratiquer le *binge drinking*. Bien qu'ils soient les acteurs majoritaires de ce mode de consommation, l'OFDT montre que les adultes pratiquent également ce type de consommation. En 2017, 16% des 18-75 ans ont déclaré avoir bu au moins 6 verres au cours d'une même occasion le mois précédant l'enquête. Toutefois, Richard et ses collaborateurs montrent bien que la pratique de l'API est plus forte chez les 18-24 ans avec 54,1% (66,2% chez les hommes et 41,9% chez les femmes) et qu'elle diminue avec l'âge pour atteindre 19,7% chez les 65-75 ans (32,3% chez les hommes et 8,6% chez les femmes) au profit d'une consommation plus régulière (2,3% chez les 18-24 ans vs 26% chez les 65-75%) avec une différence entre les sexes également présente (38,5% des hommes vs 15% des femmes) (Richard *et al.*, 2019). D'autre part, cette expérience de l'ivresse peut commencer plus jeune. En effet, l'enquête HBSC révèle qu'environ 7% des élèves de 11 à 15 ans déclarent s'être déjà retrouvés en état d'ivresse (5% en classe de 6^{e} vs 30% en 3^{e}).

Considérant que l'adolescence est une période critique dans la maturation cérébrale et que l'abus d'alcool par ce mode de consommation, se traduisant par une forte éthanolémie sur une courte période de temps, peut avoir des effets désastreux sur le développement cérébral, ces chiffres apparaissent alarmants.

3. Conséquence du *Binge Drinking* à court et moyen terme

La pratique du *binge drinking* peut avoir de graves conséquences sur la santé. À court terme, quelques minutes à plusieurs heures après la prise massive d'alcool, cette dernière peut entrainer de nombreux problèmes : comas éthyliques, accidents et blessures dus à une perte de contrôle moteur (en particulier les accidents de la route), les agressions physiques et/ou sexuelles, des comportements à risques (Miller *et al.*, 2007) et également les pertes de mémoire transitoires, appelées « *black-out* ». Ces *black-out* sont définis par une amnésie sans perte de conscience pendant un épisode de prise d'alcool en grande quantité (Jennison and Johnson, 1994). Ils sont associés à des atteintes de l'hippocampe, notamment une inhibition des fonctions de ce dernier mais également la mise en place de phénomènes de neuroinflammation et de neurotoxicité particulièrement importante dans les processus de mémorisation (pour revue (Lee *et al.*, 2010; Hermens and Lagopoulos, 2018)). Il a également été mis en évidence que plus la quantité d'alcool ingérée et la fréquence des épisodes de *binge drinking* sont importantes, plus grand est le risque de développer de nombreux problèmes associés à l'alcool (Esser *et al.*, 2012). Ces problèmes sont d'autant plus importants qu'ils touchent une population jeune, à un âge où le cerveau n'a pas encore terminé sa maturation (se terminant vers les 25 ans) (Arain *et al.*, 2013). L'adolescence est également une période pendant laquelle l'individu est plus susceptible de consommer de l'alcool, poussé par une pression sociale mais également par la maturation tardive des structures cérébrales impliquées dans le contrôle inhibiteur (tel que le cortex préfrontal) l'incitant à perpétrer des comportements à risque (Casey, Jones and Hare, 2008). C'est également une période pendant laquelle le cerveau est le plus sensible à certains effets de l'éthanol. Ceci s'illustre en clinique chez les jeunes adultes puisqu'à dose d'alcool ingérée équivalente, les individus âgés de 21 à 24 ans présentent des perturbations plus importantes de la mémoire sémantique et visuelle

que des individus âgés de 25 à 29 ans (Acheson, Stein and Swartzwelder, 1998). Cet effet est retrouvé dans les modèles animaux puisque plusieurs études mettent en évidence que les atteintes cérébrales associées à l'alcool et au *binge drinking* sont plus importantes chez des rongeurs adolescents que des adultes, notamment en ce qui concerne la mémoire et la neurogénèse (Crews *et al.*, 2000, 2006; White *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré, chez le rat, que l'alcool avait un effet accentué sur les structures à maturation tardive, comme l'hippocampe ou encore le cortex préfrontal (CPF) (White and Swartzwelder, 2004).

À moyen terme, plusieurs jours après l'exposition au *binge drinking*, les atteintes sont plus sévères, notamment en ce qui concerne la mémoire. Un paradigme de *binge* consistant à administrer 3 fois par jour pendant 4 jours de l'éthanol à la dose de 5g/kg par voie intra gastrique (méthode dite de gavage) montre une neurodégénérescence des structures du système corticolimbique (incluant l'hippocampe) ainsi qu'une atteinte des fonctions cognitives associées (Obernier *et al.*, 2002). Des épisodes alcooliques répétés peuvent mener à des troubles affectifs et comportementaux avec des replis sur soi, une agressivité accrue et des états anxio-dépressifs pouvant conduire au suicide. Un comportement que l'on retrouve augmenté chez les jeunes adultes de 18-25 ans pratiquant le *binge drinking* (Gonzalez, 2012). Notre laboratoire a précédemment montré sur un modèle animal que des doubles épisodes de *binge drinking* (2 injections massives d'alcool (3g/kg, i.p., v/v) à 9 heures d'intervalle) suffisaient à abolir de manière sélective la dépression à long-terme (DLT) dans l'hippocampe, processus neurobiologique nécessaire à la mémorisation. Dans ce modèle, les atteintes de la plasticité ne sont récupérées que 4 jours après la première injection (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016; Drissi *et al.*, 2020). Ces résultats montrent l'impact que peut avoir seulement quelques *binges* sur la mémoire et la nécessité de comprendre ces mécanismes pour élaborer de meilleurs stratégies de prévention et/ou de prise en charge pour la population adolescente et les jeunes adultes.

4. *Binge Drinking*, adolescence et différences liées au genre

La multiplication des consommations de type *binge drinking* entraine des conséquences importantes sur le système nerveux central (SNC) chez l'adolescent et le jeune adulte. À long terme, il a été montré que la pratique du *binge drinking* chez les adolescents est liée à de sérieux problèmes psychosociaux, incluant des comorbidités psychopathologiques (Deas *et al.*, 2002), de plus faibles résultats académiques (Kristjansson, Sigfusdottir and Allegrante, 2013), et des troubles neurocognitifs (Jacobus and Tapert, 2013). De plus, la précocité de l'initiation à la consommation massive d'alcool augmente significativement le risque de développement d'un trouble de l'usage d'alcool à l'âge adulte, et donc des problèmes qui lui sont liés (Hingson, Heeren and Winter, 2006). C'est également le cas chez l'animal puisqu'un paradigme d'intoxication intermittent à l'éthanol chez des rongeurs adolescents augmente la consommation et la motivation à consommer à l'âge adulte (Alaux-Cantin *et al.*, 2013). Chez les rats, malgré le fait que les femelles présentent une consommation plus élevée que les mâles, ces derniers semblent plus sensibles à l'augmentation de consommation induit par l'exposition pendant l'adolescence (Maldonado-Devincci *et al.*, 2010), contrairement aux souris, chez qui les femelles semblent les plus sensibles (Strong *et al.*, 2010). Cette différence peut être causée par le modèle animal, mais également pas les paradigmes d'alcoolisation qui peuvent être très divergents, tant sur la dose d'éthanol administrée, que sur la fréquence et la durée des administrations. Cependant cette différence entre mâles et femelles est très intéressante puisqu'on la retrouve chez l'Homme. En effet, les récentes données épidémiologiques montrent une diminution des écarts de consommation, notamment chez les jeunes. L'INPES montre que le *binge drinking* régulier chez les moins de 17 ans a augmenté de 44,4% chez les jeunes filles entre 2008 et 2014 contrairement aux jeunes garçons chez qui les niveaux de consommation restent stables pendant cette même période (INPES, 2014). Ceci est d'autant plus important que de nombreuses études montrent depuis quelques années que les femmes seraient plus sensibles aux effets toxiques de l'alcool que les hommes. Cela passerait par des atteintes cognitives plus sévères à consommation égale (Zeisser *et al.*, 2013; Agabio *et al.*, 2016) et ce, même si la femme élimine plus rapidement l'éthanol que l'homme (Thomasson, 2000; Dettling *et al.*, 2007). Dans ce contexte, il apparait important que la

recherche s'intéresse à la compréhension des effets délétères du *binge drinking* sur le cerveau immature des adolescents et jeunes adultes, en prenant compte des différences qui pourraient être liées au sexe.

La plupart des études cliniques dans les populations pratiquant le *binge drinking* montrent une atteinte des volumes des différentes structures cérébrales. Ainsi, l'utilisation de l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) sur des adolescents âgés de 12 à 17 ans avant et après 3 années de pratique du *binge drinking* montre une diminution des volumes de matières grises et blanches cérébrales dans différentes structures (Squeglia *et al.*, 2014). La suite de cette étude révèle que plus les épisodes de *binge drinking* sont réguliers et fortement alcoolisés, plus les atteintes sont importantes avec une réduction du volume du néocortex en plus de celle du cortex préfrontal (CPF), frontal (CF) et temporal (CT) (Squeglia *et al.*, 2015). Des résultats similaires ont déjà été rapportés par l'équipe de De Bellis qui montre chez des adolescents de 17 ans présentant des troubles de l'usage de l'alcool (TUA) une diminution des volumes de du CPF, du thalamus et du cervelet. Les auteurs soulignent également une différence liée au genre puisque chez les jeunes hommes, l'initiation précoce à la consommation d'alcool entraine une diminution plus importantes du volume du cervelet à l'adolescence comparativement aux jeunes femmes présentant des niveaux de consommation similaire (De Bellis *et al.*, 2005). Chez des adolescents pratiquant le *binge drinking*, définit dans ces études comme la prise de 4 verres pour un homme et 3 verres pour une femme au cours de la même occasion, il a été mis en évidence des atteintes des volumes des substances grise et blanche du cervelet (Lisdahl *et al.*, 2013), et de l'épaisseur des cortex frontal et temporal sans différence liée au genre (Pfefferbaum *et al.*, 2016). Toutefois, les auteurs ont observé une diminution des volumes corticaux et une augmentation des volumes de substance blanche chez les jeunes adultes comparativement aux jeunes adolescents, sans antécédent de *binge drinking* (Pfefferbaum *et al.*, 2016), montrant le rôle de la maturation dans les volumes cérébraux. Dans un modèle animal, il a également été trouvé des altérations de ces volumes chez des souris adolescentes mâles exposées à un protocole de binge drinking. Ce protocole est composé d'une administration d'éthanol (5g/kg) en intra-gastrique par jour, pendant 10 jours, suivie d'un enregistrement à l'âge adulte. Avec ce protocole, Coleman et ses collaborateurs ont mesuré une diminution des volumes et de la densité du bulbe olfactif et du prosencéphale, sans atteintes des performances lors d'un test du Labyrinthe de Morris

(Morris Water Maze – MWM) (Coleman *et al.*, 2011). Il a également été montré que la pratique du *binge drinking* de manière intense, appelée « *heavy drinking* », est associée à une réduction des volumes de la substance grise dans les régions impliquées dans les fonctions exécutives, dans la régulation des émotions et dans la mémoire, mais également dans des atteintes des systèmes de la récompense et du stress impliqués, entre autres, dans les comportements d'addiction (Meda *et al.*, 2017). Chez des *bingers* récents, définit par la consommation de 5 verres d'alcool pour un homme et 3 verres pour une femme pendant la même occasion, une seule fois pendant le mois précédent l'étude, il a été mis en évidence une altération de l'épaisseur corticale de l'hémisphère gauche, dépendante du sexe puisque les jeune femmes *bingers* présentaient une augmentation de cette épaisseur tandis que les jeunes hommes montraient une diminution de ce facteur (Squeglia *et al.*, 2012). Ces atteintes se traduisaient par une diminution des performances visuospatiales, du contrôle inhibiteur et de l'attention chez les femmes alors que seule l'attention était altérée chez les hommes (Squeglia *et al.*, 2012), soulignant une vulnérabilité des fonctions cognitives plus importante chez les jeunes femmes.

En accord avec ces résultats, il a été observé chez des individus considérés comme « *heavy drinkers* » (3,5 jours de consommation/semaine, ≥10 verres par occasion), une diminution de l'attention et des réponses inhibitrices associées à un dysfonctionnement de plusieurs structures dont l'hippocampe (Ahmadi *et al.*, 2013). Cependant, des résultats contradictoires sont retrouvés sur les atteintes des volumes cérébraux. En effet, chez des individus pratiquant le *binge drinking* (5 verres pour un homme, 4 verres pour une femme en 2h, et au moins 1 fois par semaine depuis 6 mois), on retrouve une augmentation des volumes des cortex préfrontal, striatal et médiotemporal des jeunes femmes et une diminution de ces même volumes chez les jeunes hommes (Kvamme *et al.*, 2016). Toutefois, dans le cas des troubles de l'usage d'alcool répondant aux critères du DSM-IV, les adolescents présentent des altérations inverses avec une augmentation du volume du CPF chez les hommes, et une diminution de ce volume chez les femmes (Medina *et al.*, 2008). L'hippocampe fait également partie des structures touchées par ces altérations des volumes cérébraux (Nagel *et al.*, 2005; Howell *et al.*, 2013).

Pris dans leur ensemble, ces études indiquent que les atteintes des volumes cérébraux dépendent de la quantité d'alcool ingérée pendant les périodes de *binge*, de la fréquence à laquelle les individus pratiquent cette consommation, mais également de la structure étudiée

et du sexe de l'individus. Concernant ce dernier point, on pourrait supposer que les différences observées entre les hommes et les femmes pendant l'adolescence, peuvent être la résultante de la différence des genres dans le commencement de l'élagage synaptique, qui survient approximativement 2 ans plus tôt chez les jeunes femmes (Zaidi, 2010), mais également dans l'organisation de cet élagage, plus important chez l'homme, qui pourrait impliquer les hormones sexuelles (De Bellis *et al.*, 2001).

Ces atteintes de volumes sont accompagnées de troubles fonctionnels avec des diminutions des fonctions des aires cérébrales impliquées dans l'attention, la mémoire de travail et les performances visuospatiales chez les adolescents après consommation d'alcool (Tapert *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2011). Par exemple, Campanella et ses collaborateurs ont mesuré chez des *bingers* (environ 9 verres par occasion, 2,7 jours/semaine), une augmentation de l'activité des aires motrices supplémentaires pendant des tâches de mémoire de travail, malgré des performances similaires à des sujets témoins (Campanella *et al.*, 2013). L'utilisation de l'imagerie par tenseur de diffusion (ITD) a également permis de montrer un changement de l'anisotropie fractionnelle, un marqueur d'intégrité de la substance blanche, dans plusieurs régions cérébrales associées à la « gueule de bois » dont les cortex pariétaux et temporaux, le corps calleux, mais également le cervelet (Jacobus *et al.*, 2009; McQueeny *et al.*, 2009). Ces changements de l'anisotropie peuvent être différents en fonction du sexe. En effet, l'équipe de Smith a montré chez des jeunes adultes présentant un score de *binge* de 30 ou plus sur un test AUQ (*Alcohol Use Questionnary*) une atteinte différentielle en fonction du genre. Ainsi, les jeunes femmes présentaient une augmentation de l'anisotropie fractionnelle de la substance blanche de plusieurs régions du cerveau contrairement aux jeunes hommes qui présentaient une diminution de ce facteur (Smith *et al.*, 2017). La pratique du *binge drinking*, et par extension, du « *heavy drinking* », pendant cette période de neurodéveloppement importante, semble donc altérer les structures et l'activité des régions cérébrales pouvant, sur le long terme, déboucher sur le développement d'un trouble lié à l'usage d'alcool à l'âge adulte.

Une étude chez l'Homme menée par Maurage et ses collaborateurs a montré une diminution des performances lors d'une tâche auditive simple révélant un « ralentissement cérébral » des *bingers* adolescents après une période de *binge drinking* de 9 mois (Maurage

et al., 2009). Ces résultats sont intéressants puisqu'ils rejoignent une autre étude qui s'est penchée sur une comparaison concrète des effets cognitifs du *binge drinking* en mesurant les performances d'étudiants *bingers* de 19 ans et d'individus plus âgés. Les auteurs de cette étude ont ainsi mesuré des scores similaires entre des jeunes *bingers* de 19 ans et des individus de 69 ans dans des tâches explorant les fonctions exécutives, suggérant alors que la pratique du *binge drinking* entrainerait un vieillissement précoce des structures impliquées dans les fonctions cognitives (Sanhueza, García-Moreno and Expósito, 2011). L'équipe de Maurage a, par la suite, comparé des *bingers* avec des individus consommant autant d'alcool mais de manière plus répartie dans le temps, révélant une plus grande atteinte des fonctions cognitives visuelles (*visual oddball task*) chez les *bingers*. Cette étude souligne l'importance non seulement de la quantité d'alcool ingérée mais également du pattern de consommation alternant phase de consommation et de sevrage (Maurage *et al.*, 2012). Chez les adolescents et les jeunes adultes, il a été mis en évidence une diminution de l'activation du CPF antérieur pendant un exercice de mémoire de travail visuel (Crego *et al.*, 2010), contrairement à l'équipe de Schweinburg qui montre une hyperactivation des régions frontales et pariétales associée à une hypoactivation de l'hippocampe (Schweinsburg *et al.*, 2010). Cette différence peut être la cause de la définition de *binge drinking* utilisée dans ces deux études (voir tableau 1). De plus, une étude comparant les profils d'étudiants « *low drinkers* » (pas de TUA, moins de 3 jours de consommation par semaine depuis 6 mois) et « *heavy drinkers* » (TUA déclaré, plus de 3 jours de consommation par semaine depuis 6 mois et pratiquant le *binge drinking* avec 5 verres pour les hommes et 4 pour les femmes, lors de leurs jours de consommation), montre une augmentation locale de la quantité d'oxygène (signal de type *BOLD : Blood-oxygen-level dependent*) associée à une hyperactivation des régions impliquées dans l'attention visuelle, la motivation et la mémoire, notamment l'hippocampe, chez les « *heavy drinkers* » lorsqu'ils voient un stimulus rappelant l'alcool, sans différence notable entre les sexes (Dager *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter qu'en présence d'un stimulus associé à l'alcool, les jeunes *bingers* présentent une augmentation de l'activation des régions mésocorticolimbiques, incluant l'hippocampe (Cservenka and Brumback, 2017) mais également une augmentation de la réponse des potentiels évoqués associés à l'alcool, et que cet effet est plus prononcé chez les hommes que chez les femmes (Petit *et al.*, 2013).

La pratique du *binge drinking* est également associée à une diminution des performances exécutives (Gil-Hernandez *et al.*, 2017) ainsi qu'une altération de la mémoire prospective

(Heffernan *et al.*, 2010) et à une plus faible mémoire déclarative (Parada *et al.*, 2011). Carbia et ses collaborateurs ont montré que, sur un suivi de 6 ans, les *binge drinkers* ont plus de difficultés dans le rappel immédiat et différé d'une information verbale comparativement à des individus témoins. De plus, ils ont mis en évidence une récupération des fonctions cognitives chez des individus ayant arrêté la pratique du *binge drinking* depuis plus de 44 mois (Carbia *et al.*, 2017).

Il est intéressant de noter qu'à l'aide de l'IRM fonctionnelle, il a été mis en évidence une activité altérée des différents lobes cérébraux lors de tâche de mémoire de travail spatiale chez des adolescents *bingers* avec une augmentation de l'activité chez les hommes, mais une diminution chez les femmes soulignant une différence de sensibilité à la consommation de type *binge drinking* (Squeglia *et al.*, 2012). Concernant l'aspect fonctionnel, les fonctions du CPF dorsolatéral sont plus fortement diminuées chez les jeunes femmes pratiquant le *binge drinking* (Scaife and Duka, 2009) et de la même manière, ces jeunes femmes présenteraient des mémoires visuelle et spatiale plus sensibles que les jeunes hommes (Townshend and Duka, 2005) . De plus, les jeunes femmes développeraient une « tolérance cognitive » aux effets du *binge drinking* plus rapidement que les jeunes hommes, notamment dans des tâches de mémoire de travail visuelle (Vinader-Caerols *et al.*, 2017). Pour le détail des modalités des études cliniques abordés dans cette partie, nous invitons le lecteur à se reporter sur le tableau suivant (Tableau 1).

Chez le rat, à l'aide d'un paradigme appelé « *4-day binge paradigm* » consistant en un gavage d'éthanol à 5g/kg suivi de 3 injections intragastrique d'éthanol par jour pendant 4 jours, et résultant en une alcoolémie importante (270mg/dL en moyenne), il a été mis en évidence une neurodégénérescence de type nécrotique après 2 jours dans le bulbe olfactif et après 4 jours dans un grand nombre de structures chez le rat mâle adulte (Obernier, Bouldin and Crews, 2002). Ces atteintes sont accompagnées d'une diminution des performances dans différents tests cognitifs tels que le NOR, le MWM, l'apprentissage inversé, les tests de mémoire de référence spatiale et de mémoire de travail spatiale, nécessitant, pour la plupart, l'hippocampe (Obernier, Bouldin and Crews, 2002). Il a également été montré une diminution de la survie et de la prolifération des cellules progénitrices neurales au sein de l'hippocampe jusqu'à 28 jours après ce paradigme (Nixon and Crews, 2002), alors que l'intoxication d'un unique épisode de *binge drinking* (5g/kg, 30% w/v, gavage), est suffisant pour diminuer la

prolifération (Nixon and Crews, 2002). Vetreno et Crews ont montré en utilisant un modèle de *binges* répétés pendant l'adolescence (2 jours à 5g/kg, 20% w/v en gavage, puis 2 jours abstinent, alternés pendant 30 jours) une perte de la neurogénèse au niveau de l'hippocampe dorsal, pouvant se traduire à l'âge adulte par une perte cognitive (Vetreno and Crews, 2015). Des études récentes montrent que ces *binge*s répétés provoquent une perte neuronale plus forte dans le gyrus denté de l'hippocampe des femelles que des mâles, accompagnée d'une mort cellulaire plus importante (Maynard *et al.*, 2018). Ces atteintes cellulaires sont associées avec une altération des performances lors de test de navigation spatiale accompagnée d'une diminution d'expression des molécules trophiques dans l'hippocampe. Cependant, un test après une séance de *binge drinking* chez la femelle permet d'augmenter les molécules de support trophique et stimule la repopulation des neurones du gyrus denté (Maynard *et al.*, 2018). Chez la ratte adolescente, un protocole de *binge drinking*, 1 à 4 cycles de 3 jours « on » - 4 jours « off » d'administrations intragastriques à 3g/kg, permet de mettre en évidence une diminution de la mémoire de reconnaissance et des niveaux de *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*) 7,5 heures après le dernier cycle. Ces perturbations sont récupérés après 14 jours de sevrage mais toujours associés avec une augmentation de l'immunoréactivité de GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Fernandes *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que la pratique du *binge drinking* chez les rattes adolescentes provoque une altération transitoire de l'astrogliose de l'hippocampe, récupérée après une période de sevrage, témoignant des capacités de plasticité du cerveau.

Aussi, et comme présenté succinctement dans cette partie, l'alcool, et plus particulièrement le *binge drinking*, peut provoquer des troubles dans différentes structures cérébrales. Chez les jeunes, il est associé à un risque accrue de développer à l'âge adulte un comportement alcoolodépendant (Townshend and Duka, 2005; Kuntsche *et al.*, 2017) ce qui en fait un facteur de vulnérabilité important. D'autant plus que certains des troubles observés chez les individus pratiquant le *binge drinking* sont similaires à ceux que l'on peut observer chez des sujets alcoolodépendants (Petit *et al.*, 2014). Les différences de genre observées dans les études cliniques, comme dans les études précliniques, poussent la réflexion vers une prise en considération du sexe des sujets dans les études, ce qui serait bénéfique à une compréhension plus poussée des effets du *binge drinking* sur le système nerveux central, et plus particulièrement, sur l'hippocampe et la mémorisation, dont une majorité des modèles étudiés semblent indiquer une altération.

Tableau 1: Résumé de la méthodologie et des effets observés sur les études cliniques portant sur le binge drinking

Abréviations : moy. : moyenne ; aug. : augmente ; dim. : diminue ; sem. : semaine ; env. : environ ; occas. : occasion ; avt. : avant ; ap. : après ; vol. : volume ; subs. : substance ; CPF : cortex préfrontal ; lat. : latéral ; CT : cortex temporal ; TC : tronc cérébral ; init. : initiation ; ado. : adolescence ; TUA : trouble de l'usage d'alcool ; HD : heavy drinkers ; BD : binge drinking/drinkers ; LD : low drinkers ; Question. : questionnaire ; hipp. : hippocampe ; CC : corps calleux ; hémis. : hémisphère ; AF : anisotropie fractionnelle ; BEC : éthanolémie ; AUQ : Alcohol Use Questionnary ; NP : test neuropsychologique ; conso. : consommation ; PE : potentiels évoqués (EEG) ; MWS : mémorie de travail spatiale.

Auteurs	Âge (ans)	N participants	Modalité alcoolisation	Tests	Effets	Différence ♂/♀
Hingson 2006	Adultes	43093	Âge première conso	Question. DSM	Initiation précoce (14 ans) aug. risque développer TUA à l'âge adulte	/
Squeglia 2014	12-17	40	suivi sur 3 ans avt. et ap. prise d'alcool. HD : 6 verres/occas. ; env. 100 verres au total	IRM	Dim. vol. subs. grise et blanche plus importantes chez les HD	/
Squeglia 2015	12-16	134	HD suivis sur 8 ans	IRM	Dim. vol. matière grise CPF lat. Et CT Dim. vol. matière blanche CC et pont du TC	/
De Bellis 2005	moy. 17	42	TUD : 7 verres/occas. ; max 12 ≥ 3 verres/sem.	IRM	<u>TUA :</u> dim. vol. CPF, thalamus, cervelet. ♂ : init. précoce dim. importantes cervelet à l'ado. ♀ : pas d'effet d'initiation précoce	oui
Pfefferbaum 2015	15-18	88	BD : ≥ 4 verres ♂, 3 verres ♀/ occas.	IRM	<u>Jeunes adultes vs ado :</u> Dim. vol. et épaisseur vortical Dim. vol. subs. Blanche BD aggrave les diminutions	non

Lisdahl 2013	16-19	106	BD : ≥ 5 verres ♂, 4 verres ♀/ occas. 1 BD/3 mois précédent	IRM	Dim. vol. subs. grise et blanche cervelet	non
Squeglia 2011a	16-19	59	BD récent : 5 verres ♂, 3 verres ♀/ occas. 1 seul BD/ 1 mois précédement	IRM NP	♂ BD dim. épaisseur cortical hémis. gauche vs ♂ ctrl ; dim. performances attention ♀ BD aug. épaisseur cortical hémis. gauche vs ♀ ctrl ; dim. performances visuospatiale, inhibition, attention	Oui
Meda 2017	18-23	122	LD vs HD LD ≤13 BD / 26 mois HD ≥13 BD / 26 mois	IRM	HD : dim. vol. subs. grise régions exécutive, émotions, mémoire, système de la récompense, stress.	/
Ahmadi 2013	18-20	92	LD vs HD LD : 1 jour/sem. ; 2 verres, sans abus HD : 3,5 jours/ sem. ; 10 verres, TUA (91%)	IRM BOLD Go-no Go	HD: dim. attention et réponse inhibitrice avec dysfonction de différentes structures dont l'hipp.	/
Kvamme 2016	moy. 21	76	BD : ≥5 verres ♂, 4 verres ♀ / 2h 1 BD/sem depuis 6 mois	IRM AUDIT	♀BD : aug. vol. CPF, striatal et médiotemporal ♂BD : dim. vol. CPF, striatal et médiotemporal	oui
Medina 2008	15-17	31	TUA répondant aux critères du DSM-IV	IRM	Ado TUA alteration vol. CPF antérieur ♀ TUA dim. VS ♀ ctrl ♂ TUA aug. VS ♂ctrl	oui
Nagel 2005	15-17	31	TUA, BD le week end BEC env. 1,0g/L	IRM	Ado. TUA: dim. vol. hipp. gauche sans répercussions sur la mémoire	/
Campanella 2013	moy. 20	32	BD : 2,7 jours/sem. Env. 9 verres/occas.	IRM fonctionnelle NP	BD : aug. activité aire motrice supplémentaire pdt tâche de mémoire de travail malgré performances similaires aux ctrl	/

Jacobus 2009	16-19	42	BD : ≥ 5 verres ♂, 4 verres ♀ 1 BD / 3 mois précédent	ITD	BD : dim. AF cortex pariétal, temporal, CC, cervelet	/
McQueeny 2009	moy. 18	28	BD : ≥ 5 verres ♂, 4 verres ♀ 1 BD / 3 mois précédent	ITD	BD : dim. AF aire des subs. blanche	/
Smith 2015	18-25	40	BD score ≥30 sur test AUQ	ITD NP	♀BD : aug. AF subs. blanche ♂BD : dim. AF subs. blanche Dim. mémoire de travail chez ♂ et ♀	oui
Tapert 2002	16	73	Étude longitudinale de 16 à 24 ans Antécédents de TUA HD représente env. 23 conso./mois	NP Question.	HD associé à des difficultés de rétention, d'apprentissage et d'attention Sevrage induit pb visuospatial	/
Hanson 2011	13-18	84	Étude longitudinale sur 10 ans Antécédents de TUA HD représente environ 53 verres/mois	NP	HD associé à altération de la mémoire et des fonctions visuospatiale	/
Maurage 2009	moy. 18	462	Ado. sans passé de conso. BD représente env. 35 verres/sem.	NP Question. PE	Après 9 mois, BD présentent des latences des potentiels évoqués dans le traitement des émotions. Idée de « ralentissement cérébral »	/
Sanhueza 2011	moy. 19	91	BD : ≥8 verres ♂, 6 verres ♀ /2-3h	NP	BD de 19 ans ont des scores similaires aux adultes de 69 ans dans des tâches de fonctions exécutives. Idée de « vieillissement cérébrale »	/
Maurage 2012	moy. 21	80	LBD : ≥21 verres/sem, en 2,3 occas. HBD : ≥42 verres/sem, en 3,5 occas.	PE	HBD montrent atteintes des fonctions cognitives visuelles VS LBD	/
Crego 2010	moy. 18	95	BD : ≥6 verres/occas/ au moins 1 fois /mois ≥3 verres/ heures	PE MW visuelle	BD : hypoactivation CPF antérieur	/

Schweinburg 2010	16-18	24	BD : env. 10 verres/occas. Env. 21 verres/mois depuis 3 ans	IRMf	BD : hyperactivation région frontale et hypoactivation de l'hipp. pdt encodage verbal	/
Dager 2013	18-21	65	HD vs LD LD : sans TUA, conso. ≤ 3 jours/sem. depuis 6 mois HD : TUA, conso. ≥ 3 jours/sem. en BD BD : ≥5 verres ♂, 4 verres ♀	IRMf	HD : aug. BOLD et hyperactivation des régions impliquées dans attention visuelle, motivation, mémoire, notamment hipp. lors de la présence d'un stimulus associé à l'alcool.	non
Petit 2013	18-27	56	BD : ≥6 verres/occas. ≥3 verres/ heure ≥3 fois/sem.	PE	BD : aug. réponses associées à l'alcool ♂ plus concernés que ♀	oui
Gil-Hernandez 2017	13-22	322	Première conso. Env. 13 ans BD : ≥6 verres ♂, 4 verres ♀ (10g) pdt une occas. (3-4 heures) 1x/mois depuis 6 mois	NP	BD : aug. performance exécutrice plus faible que ctrl. Groupe 19-22 ans plus atteint par cet effet	/
Heffernan 2010	17-19	50	BD: moy. 12 verres / occas. 2,5 occas./sem.	NP Question.	BD dim. nombre de combinaison action-lieu Dim. mémoire prospective	/
Parada 2011	18-20	122	BD : ≥6 verres/occas. ; ≥1BD/mois ≥3 verres/ heure	NP	BD dim. mémoire declarative associée à l'hipp.	non
Carbia 2017	moy. 18	155	Suivi sur 6 ans BD sélectionnés via AUDIT ≥6 verres/2 heures (BEC env. 0,8g/L)	NP	BD associé avec dim. performances dans rappel immédiat et différé VS non BD Récent ex-BD (22 mois) montrent même atteintes VS long ex-BD (≥44 mois).	non
Squeglia 2016	16-19	95	BD : ≥5 verres ♂, 4 verres ♀/occas. 1x/3 mois	NP / IRMf Question.	♀BD vs ctrl : dim. activation CF, CT et cervelet pdt MWS ♂BD vs ctrl : aug. activation CF, CT et cervelet pdt MWS	oui

Scaife 2009	moy. 20	60	BD : score ≥ 24 sur test AUQ	NP Question.	BD : dim. fonctions liées aux CPF dorsolat chez ♀ Dim. fonctions liées au lobe temporal chez ♂ et ♀ Aug. impulsivité motrice	oui
Townshend 2005	moy. 20	98	BD : score ≥ 24 sur test AUQ	NP Question.	♀ BD : dim. performances mémoire de travail spatiale et test vigilance VS ctrl	oui
Vinader-Caerol 2017	moy. 22	172	BD : ≥6 verres ♂, 5 verres ♀/occas. (10g) ≥ 2 occas./mois	NP	Dim. mémoire visuelle immédiate ap. conso. alcool mais tolérance cognitive chez ♀. Mémoire de travail non touché par alcool, mais ♂≥♀	oui

L'hippocampe

Notre étude s'est intéressée à l'hippocampe, structure largement reconnue comme étant la clé de voûte des apprentissages et de la mémorisation chez l'Homme comme chez les vertébrés supérieurs. Avant de se pencher sur les effets de l'éthanol, et plus précisément de l'alcoolisation de type *binge-drinking*, sur la mémoire, il nous faut replacer cette structure dans son contexte anatomique (Figure 3).

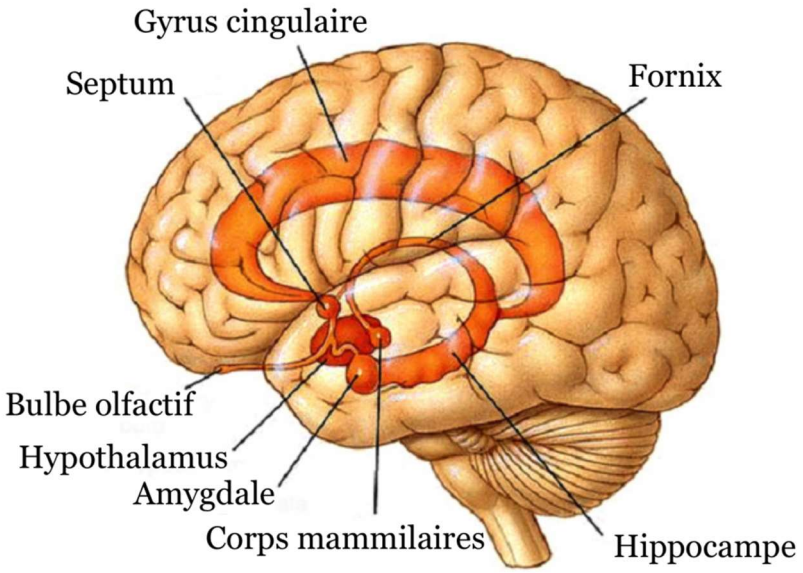


Figure 3: Représentation schématique du système limbique et de sa disposition spatiale dans le cerveau humain.

Issu de https://gettingstronger.org/2012/01/hormesis-and-the-limbic-brain/ adapté par Rabiant K.

L'hippocampe est une structure bilatérale symétrique se trouvant dans le lobe temporal médian. Elle doit son nom à sa forme particulière, donné par l'anatomiste vénitien Giulio Cesare Aranzio qui, en 1587, le compara pour la première fois avec l'animal éponyme. Chez l'Homme, l'hippocampe dépasse la corne temporale du ventricule latéral et fait partie d'une

plus grande structure que l'on nomme formation hippocampique. Sur sa partie inférieure, l'hippocampe est relié à la circonvolution parahippocampique par le gyrus parahippocampal, lui-même composé du subiculum et du cortex entorhinal. Sur sa partie supérieure, se trouve le fornix, constitué par la fimbria. L'hippocampe est connecté via le cortex entorhinal et le complexe fimbria-fornix à de nombreuses structures cérébrales telles que le cortex préfrontal, le cortex cingulaire et le cortex piriform, mais également aux structure composant le système limbique, à savoir l'amygdale, le cortex limbique, le septum, le thalamus, l'hypothalamus et les corps mamillaires. Ensemble, ces structures sont impliquées dans la gestion des émotions, l'apprentissage, la mémorisation, l'olfaction, l'homéostasie, la régulation alimentaire et le contrôle du système nerveux autonome. Cette position anatomique fait de l'hippocampe une structure impliquée dans différents systèmes cérébraux et dont la modulation peut affecter le fonctionnement de plusieurs structures cognitives.

1. Rappels anatomiques concernant l'hippocampe :

1.1 Organisation cytoarchitecturale :

L'hippocampe est organisé en deux sections, regroupées dans l'espace comme deux « C » s'emboitant l'un dans l'autre, à savoir, le gyrus denté (GD) et la Corne d'Ammon (CA). Le GD est une région, enroulée autour de l'extrémité de ce qui est appelé *hippocampus proper* faisant référence à ce que l'on appelle communément l'hippocampe et qui est constitué des quatre régions de la Corne d'Ammon. Plus précisément, le gyrus denté est composé de 3 couches cellulaires : le *stratum granulosum* contenant la plupart des corps cellulaires des neurones granulaires dont les axones forment les fibres moussues et des interneurones, le *stratum moleculare*, contenant l'arbre dendritique des cellules granulaires, ainsi que les afférences du GD, et enfin l'*hilus*, couche de cellules polymorphiques, composée d'interneurones et des collatérales issues des fibres moussues. Concernant la Corne d'Ammon, elle est séparée en 4 aires, respectivement appelées Corne d'Ammon 1 (CA1), 2 (CA2), 3 (CA3) et 4 (CA4), disposées par ordre décroissant en partant du gyrus denté. Ces

cornes possèdent 5 couches cellulaires à l'exception de CA3 qui en possède 6, et se composent de la façon suivante, de la couche la plus superficielle à la plus profonde (Figure 4) :

1) L'*alveus* : couche la plus externe de l'*hippocampus proper*, contenant les axones des cellules pyramidales qui se projettent sur le *subiculum* ou le complexe fimbria-fornix ;
2) Le *stratum oriens* : il contient les dendrites basales des neurones pyramidaux et reçoit les projections du *septum* et des fibres commissurales de l'hippocampe controlatéral (surtout au niveau de CA2 et CA3). Chez les rongeurs, cette communication est plus prononcée que chez les primates non-humains (Demeter, Rosene and van Hoesen, 1985).
3) Le *stratum pyramidale* : il contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux, principales éléments excitateurs de l'hippocampe, mais également le corps cellulaire de nombreux interneurones. Au niveau de CA3, cette couche contient également les synapses des fibres moussues qui traversent le *stratum lucidum* ;
4) Le *stratum lucidum* : uniquement dans le CA3, c'est une couche très fine dans laquelle passent les fibres moussues
5) Le *stratum radiatum* : contenant des fibres commissurales et septales, mais également les collatérales de Schaffer qui sont une projection des neurones pyramidaux du champ CA3 vers CA1. On y trouve également des interneurones.
6) Le *stratum lacunosum-moleculare* : le *stratum lacunosum* forme une couche fine contenant des collatérales de Schaffer mais également les fibres de la voie perforante issues du cortex entorhinal. Cette couche est souvent associée au *stratum moleculare* en raison de leur nature fine. Le *stratum moleculare* compose la surface où les fibres de la voie perforante forment des synapses avec les portions distales des arbres dendritiques apicaux des neurones pyramidaux.

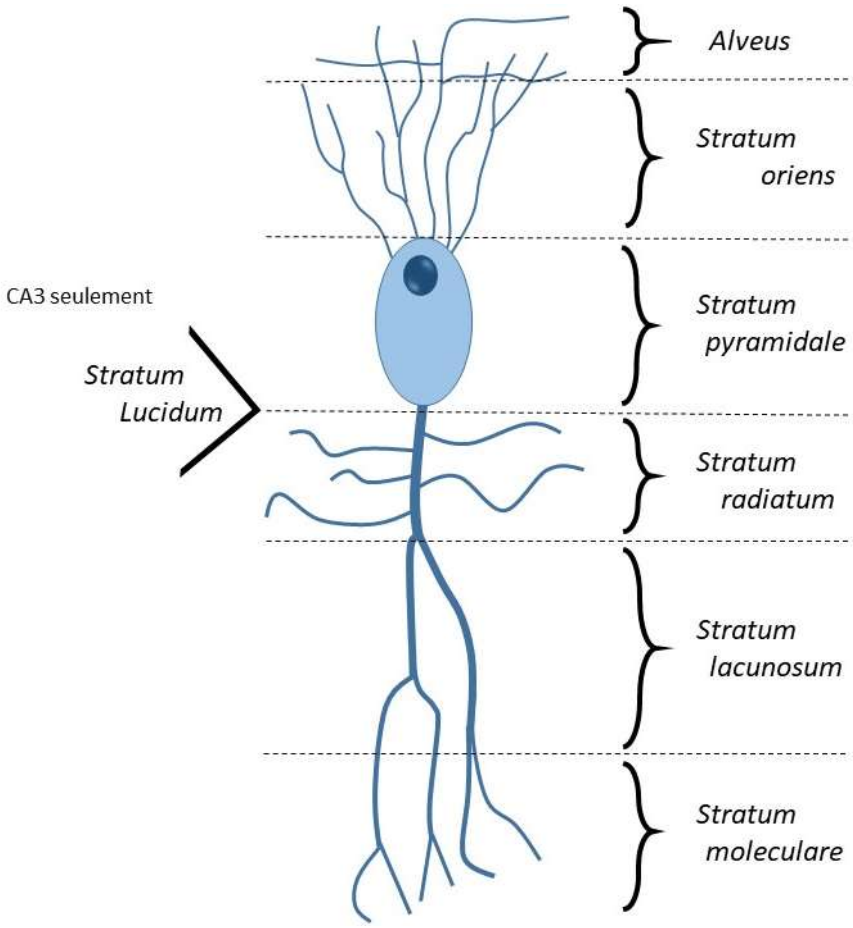


Figure 4: Représentation schématique des couches cellulaires des Cornes d'Ammon de l'hippocampe

Présentées de la plus superficielle à la plus profonde.

Rabiant K.

1.2 La circuiterie intra-hippocampique :

Les principales afférences à l'hippocampe proviennent du cortex entorhinal. À l'inverse, les efférences passent par le CA1 et vont vers le *subiculum*. Une fois dans l'hippocampe, l'information parvient à CA2 via 2 voies, une directe et une indirecte. La voie directe est composée des axones des fibres de la voie perforante provenant de la troisième couche du cortex entorhinal et se projettent au niveau de CA1 sur les dendrites apicales distales des interneurones. Cette voie monosynaptique est appelée voie temporoammonique (ou voie TA-CA1). Concernant la voie indirecte, il s'agit de la projection des fibres de la voie perforante issues de la deuxième couche du cortex entorhinal qui pénètrent dans le gyrus denté et qui vont transmettre l'information via les cellules granulaires. Observé par le neuroanatomiste

Ramon y Cajal au début du XX^{e} siècle, ce circuit part du cortex entorhinal dont les fibres perforantes forment une première synapse sur les cellules granulaires du gyrus denté. Ensuite, l'information se propage par les fibres moussues jusqu'à CA3 pour y former une deuxième synapse et enfin, les collatérales de Schaffer issues des axones des neurones pyramidaux de CA3 transmettent l'information jusqu'à CA1, formant ainsi la troisième synapse. L'information retourne ensuite dans le cortex entorhinal et le *subiculum* via les axones de CA1 pour compléter la boucle (Figure 5).

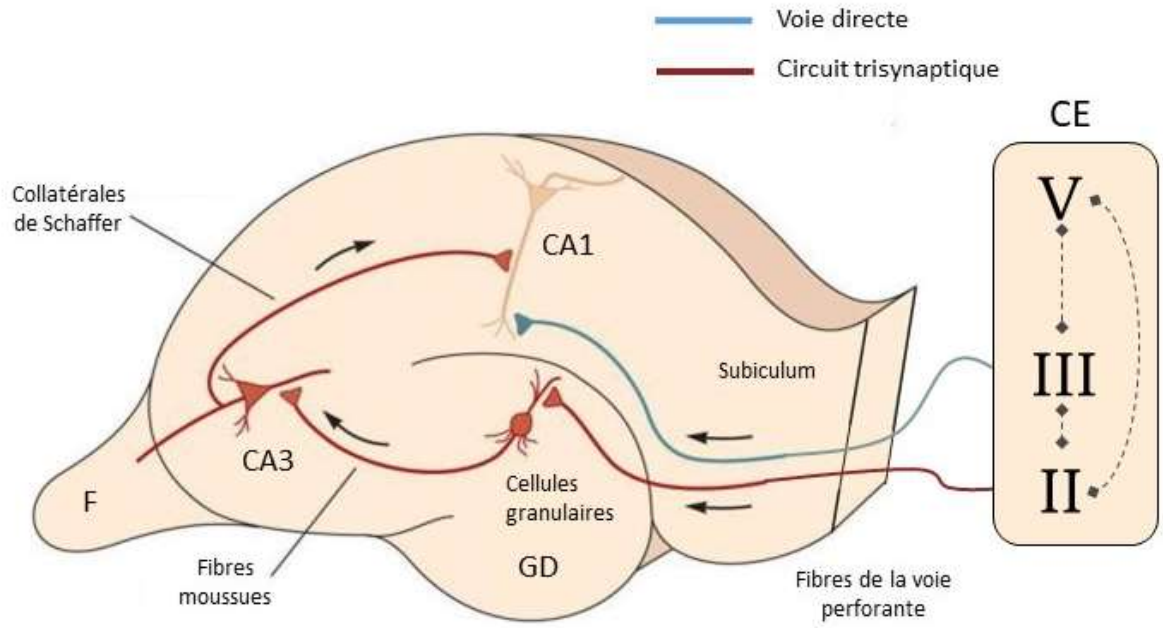


Figure 5: Représentation graphique de la circuiterie synaptique d'une tranche coronale d'hippocampe dorsal de rat illustrant la transmission trisynaptique.

CE : cortex entorhnial, GD : gyrus denté, CA3/CA1 : section 3 et 1 de la Corne d'Ammon, F : fimbria.

Principle of Neural Science – Fifth Edition, p1491, adaptée par Rabiant K.

1.3 Connexions efférentes :

Comme l'un des engrenages d'une montre gigantesque, l'hippocampe communique en permanence avec plusieurs structures cérébrales permettant la régulation de grandes fonctions. Concernant les informations envoyées par l'hippocampe, ces dernières circulent en

partie par le fornix. C'est le cas du circuit hippocampo-mamillo-thalamique, aussi appelé circuit de Papez d'après le neuroanatomiste américain James Papez qui théorisa son fonctionnement en 1937. Ce circuit est impliqué dans la mémoire et connecte l'hippocampe aux corps mamillaires par le fornix. L'information est ensuite projetée sur le noyau antérieur du thalamus par le biais des tractus mamillo-thalamique qui la relaient au cortex cingulaire au travers de la capsule interne. Enfin, le *cingulum* achève la boucle en renvoyant l'information au cortex entorhinal. De plus, le *subiculum*, relié au cortex entorhinal est une voie de sortie projetant des fibres vers diverses régions du cortex comme la circonvolution parahippocampique, le cortex cingulaire, le cortex préfrontal et le cortex orbitofrontal (Figure 6).

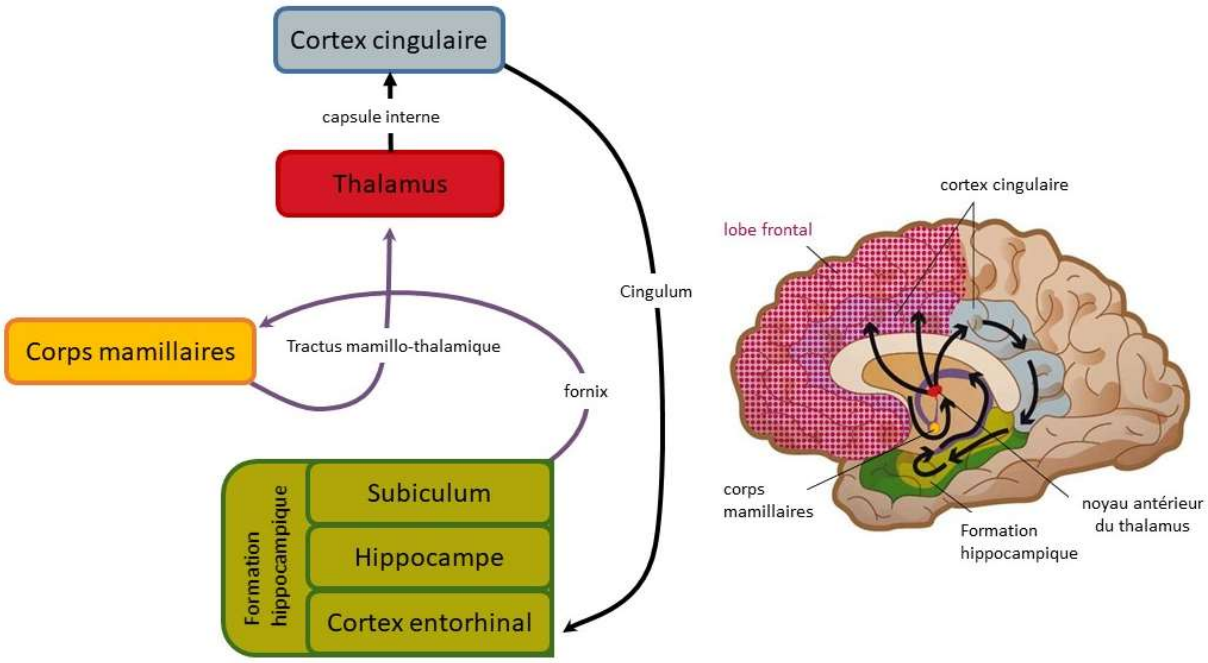


Figure 6: Représentation graphique du circuit de Papez.

Sur la gauche, connexions schématiques entre les différentes structures impliquées. Sur la droite, position anatomique des structures composant le circuit de Papez.

Extrait du site http://lecerveau.mcgill.ca, adapté par Rabiant K.

L'implication de ce circuit dans la mémoire a été mise en évidence depuis longtemps, notamment à l'aide d'études de cas de patients atteint de la maladie d'Alzheimer. Récemment, il a été montré qu'une stimulation profonde du fornix permettait de déclencher

des « *flashbacks* » mémoriels chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Deeb *et al.*, 2019), en plus de réduire la charge amyloïde, responsable de la maladie, l'inflammation et la perte neuronale chez les rats modélisant la maladie (Leplus *et al.*, 2019). Le fornix permet également de connecter l'hippocampe à d'autres structures comme l'hypothalamus, la formation réticulée, le noyau accumbens et le tronc cérébral. Parmi ces structures, certaines émettent en retour des informations vers l'hippocampe.

1.4 Connexions afférentes :

Concernant les informations envoyées à l'hippocampe, elles proviennent de 4 régions principales. La première est le cortex entorhinal, intimement lié à l'hippocampe, qui transmet les informations provenant des cortex préfrontal, cingulaire, temporal et pyriforme, mais également de l'amygdale, des aires pariétales, visuelles et olfactives et enfin du pré-subiculum. Ensuite, les hippocampes sont reliés entre eux par la fimbria. Le tronc cérébral envoie des fibres provenant du noyau médian du raphé et du locus cœruleus, dont une étude récente a montré qu'une extinction de son activité altérait la formation de la mémoire au niveau de CA3 (Wagatsuma *et al.*, 2017). Enfin, le septum médian se projette également sur l'hippocampe et jouerait un rôle dans la génération des ondes thêta intra-hippocampiques dont les fonctions sont encore débattues mais dont la fréquence des oscillations auraient un rôle dans la navigation spatiale chez l'Homme, mais également chez les rongeurs (Bohbot *et al.*, 2017).

2. Hippocampe et mémoire :

L'une des premières occurrences de l'implication d'une partie de l'hippocampe dans les processus mnésiques a été faite par trois scientifiques dans les années 1880 qui décrivirent une atteinte cérébrale provoquant l'amnésie. De manière intéressante, dans le contexte de nos études, cette condition était associée avec la consommation massive d'alcool et a été nommée plus tard la psychose de Wernicke-Korsakoff. En 1881, Carl Wernicke travailla sur trois patients, dont deux souffraient d'alcoolisme chronique. Il pratiqua à leur décès une

autopsie révélant une atteinte de la substance grise autour du troisième et du quatrième ventricule. D'un autre côté, Sergeï Korsakov observa des cas cliniques similaires dont le symptôme principal était un déficit mémoriel. Enfin, Johann Bernhard Aloys von Gudden associa plus tard ces symptômes avec une atteinte des corps mamillaires et du thalamus, cibles importantes de la formation hippocampique. En 1900, Vladimir Bekhterev a mis en évidence un ramollissement bilatéral des hippocampes et du cortex environnant lors de l'autopsie de deux patients souffrant d'un déficit important de la mémoire. Ces résultats sont parmi les premiers à associer hippocampe et mémoire.

En 1957, les Dr William Scoville et Brenda Milner travaillèrent sur le cas H. M. qui présentait des crises épileptiques puissantes et résistantes aux traitements de l'époque. À la suite de sa chirurgie consistant en l'ablation d'une partie du lobe temporal dans lequel se trouve l'hippocampe, le patient souffrait d'une profonde amnésie antérograde totale et rétrograde légère, d'environ 11 ans (Corkin, 1984), qui persista jusqu'à sa mort en 2008. Henri Gustav Molaison (26 février 1926 - 2 décembre 2008) était incapable de mémoriser de nouveaux éléments après son opération, mais gardait des souvenirs antérieurs à sa chirurgie. Il était également capable de mémorisation à court terme, c'est-à-dire, de se souvenir pendant une période courte de certains éléments (items) puisqu'il était capable de répéter des mots et de rester concentré. Cependant, après une courte pause ou une distraction quelconque, il les oubliait rapidement. Les capacités intellectuelles de Mr Molaison restèrent toutefois intactes, suggérant que les fonctions cognitives sont dissociables des fonctions mémorielles et régies par des structures cérébrales différentes. Un autre phénomène intéressant concerne la mémoire procédurale, liée aux habiletés et aux automatismes, puisque Mr Molaison était capable, lors d'un test de dessin en miroir, d'améliorer ses performances au cours de la journée et même d'un jour à l'autre sans jamais se souvenir d'avoir effectué cette tâche auparavant (Milner, Squire and Kandel, 1998; Squire, 2009). Ce fait démontre l'existence de plusieurs types de mémoire à long-terme, dépendant de différentes structures cérébrales. L'équipe du Pr Squire en 2004 a classifié et caractérisé les différents types de mémoires à long-terme (Figure 7), subdvisées en mémoire déclarative dite explicite, impliquant l'hippocampe, et en mémoire non-déclarative dite implicite, n'engageant pas l'hippocampe (Squire, 2004).

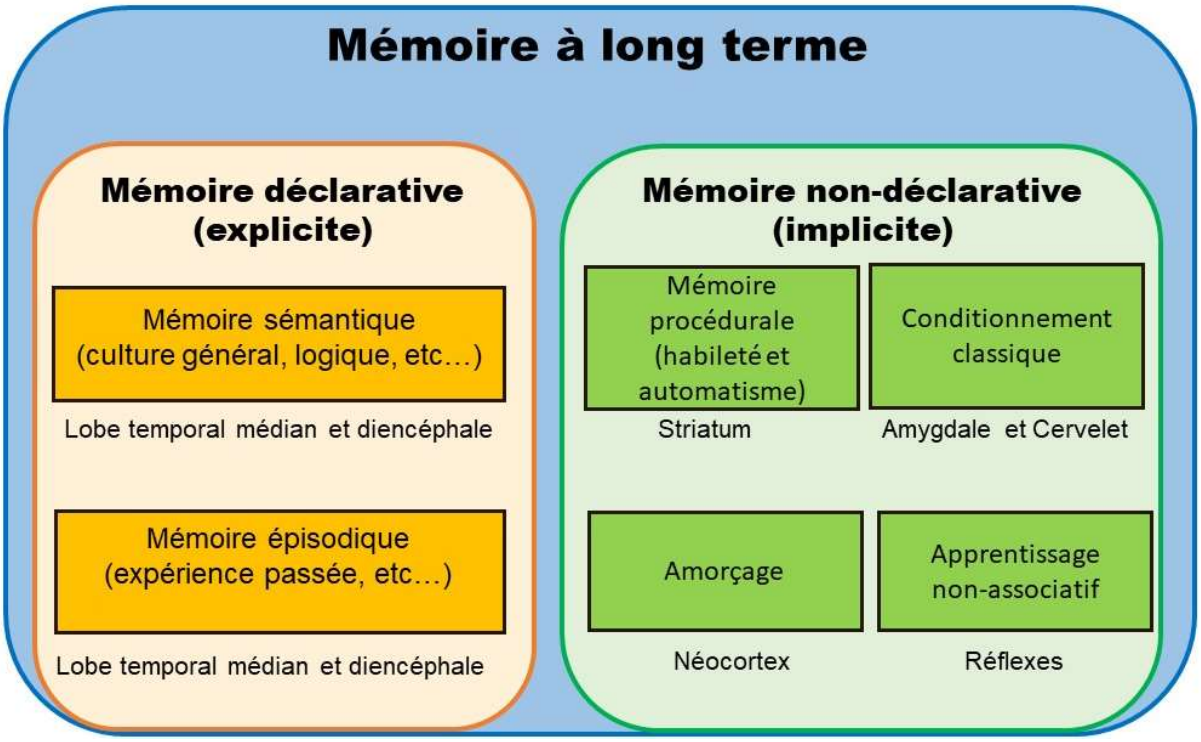


Figure 7: Catégorisation des différentes mémoires à long terme

D'après les travaux de Squire, 2004 ; adapté par Rabiant K.

La **mémoire déclarative** fait référence à la mémoire qui peut être évoquée, transmise oralement. Dans cette mémoire, on distingue la **mémoire sémantique** qui reflète nos connaissances générales et la compréhension de notions abstraites, et la **mémoire épisodique**, qui représente toute nos expériences personnelles passées. Ce type de mémoire fait intervenir le lobe temporal médian, et donc l'hippocampe, mais également le diencéphale.

Au contraire de la mémoire déclarative, qui peut être communiquée à autrui, la **mémoire non-déclarative**, également appelée implicite, fait référence à un rappel non-conscient des expériences et des informations. On y retrouve la **mémoire procédurale** qui va nous permettre d'apprendre une habileté motrice par exemple, et qui fait intervenir le striatum. On retrouve également la **mémoire d'amorçage**, qui va permettre de reconnaître par exemple des éléments inachevés (une moitié de dessin, le début d'un slogan, etc.), et qui fait appel au néocortex. Le **conditionnement classique** est un apprentissage que l'on retrouve dans la mémoire non-déclarative, il va permettre d'associer un stimulus à un évènement ou à une action. Il a été théorisé et mis en évidence par Ivan Pavlov au début du XX^{ème} siècle (Pavlov, 1929). Ce type d'apprentissage fait appel à l'amygdale et au cervelet. Enfin, **l'apprentissage**

non-associatif désigne les apprentissages se traduisant par l'augmentation ou la disparition d'une réponse face à un stimulus répété. Il utilise la voie des réflexes.

3. Plasticité synaptique

La mise en mémoire de l'information nécessite des modifications de la communication des neurones dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe. La plasticité synaptique est l'un des mécanismes pouvant expliquer le phénomène de mémorisation. On peut définir simplement la plasticité synaptique comme étant la capacité des neurones à modifier la force ou l'efficacité de leur transmission synaptique sans rompre leur connexion. Ces modifications peuvent être plus ou moins rapides et/ou durables et se font en fonction des stimuli et du développement de l'individu. Elles peuvent se traduire par une augmentation de la communication entre les neurones, c'est ce qu'on appelle la Potentialisation à Long Terme (PLT), ou à l'inverse, une diminution de la communication qui s'appelle la Dépression à Long Terme (DLT). Ces deux types de plasticité seront détaillées par la suite. Notre étude s'est intéressée à ces mécanismes que nous allons développer dans cette partie.

3.1 Concept de la plasticité synaptique :

Le cerveau possède des capacités d'adaptation lui permettant de modifier l'efficacité de ses connexions entre les neurones. Cette notion a fait bien du chemin depuis son ébauche dans le début des années 1900 jusqu'aux connaissances actuelles. D'abord théorisée par des neuropsychologues comme William James et Eugenio Tanzi, la notion de plasticité cérébrale se popularisa sous l'impulsion de Konorski en 1948 qui attribua au SNC deux propriétés fondamentales, à savoir la réactivité et la plasticité, en affinant leur définition morphologique (Konorski, 1948). Cependant c'est Donald Hebb, un neuropsychologue canadien, qui, dans son ouvrage de 1949 intitulé « *The Organisation of Behavior. A neuropsychological theory »* , posa les bases de la notion de plasticité synaptique telle qu'on l'a connait aujourd'hui. Dans cet ouvrage, Hebb suggère que la stimulation synchrone et répétée de deux ensembles de neurones interconnectés entraine un renforcement de leurs connexions, et à l'inverse, que

l'absence de stimulation entraine un affaiblissement voire une perte totale des connexions. Ainsi, les phénomènes d'apprentissages associatifs simples, de type conditionnement classique, se mettraient en place par ce genre de mécanismes. Pour reprendre les termes de Hebb : « *Quand un axone d'une cellule A est assez proche pour exciter une cellule B de manière répétée et persistante, une croissance ou des changements métaboliques prennent place dans l'une ou les deux cellules de telle manière à ce que l'efficacité de la cellule A, comme déclencheur de la cellule B, soit augmentée* » (Hebb, 1949). Cette théorie appelée « postulat de Hebb » fut reprise par la communauté scientifique contemporaine si bien que les synapses dont les propriétés évoluaient à la suite d'une activation synchrone étaient appelées « *Hebbian synapses* » (synapses de Hebb). Toutefois et comme le stipule Hebb lui-même dans son ouvrage, sa théorie ne mettait pas en avant une nouvelle idée mais ne faisait que finaliser celle déjà existante s'appelant la « résistance synaptique », énoncé par Lashley en 1924 (Lashley, 1924). Dans une lettre qu'il adresse à un collègue, il affirma qu'il n'avait pas connaissance des travaux de Tanzi à qui il crédita cette théorie. Enfin, le neurophysiologiste français Jacques Paillard argumenta l'emploi du terme « plasticité » qu'il réserva aux changements du système nerveux qui étaient à la fois structurels et fonctionnels. Il précisa que la plasticité fait référence à un changement durable, à la suite d'une force qui affecte le système à un temps « t », et l'opposa à l'élasticité, terme utilisé pour qualifier un système qui retrouve sa forme initiale une fois que la force qui l'affecte disparait (Berlucchi and Buchtel, 2009).

3.1.1 Rappel sur la transmission synaptique :

La communication entre les neurones s'appelle la transmission synaptique. Il existe deux types de transmission : le premier est électrique et utilise des jonctions communicantes (ou GAP junction) qui permettent une transmission électrique directe du neurone présynaptique au neurone postsynaptique. On peut retrouver cette transmission dans l'hippocampe de rat, au niveau de CA1 et CA3, reliant des cellules non pyramidales (Kosaka and Hama, 1985). Le second est chimique et utilise des neurotransmetteurs pour relayer l'information. Ce type de transmission est le plus répandu dans le cerveau, notamment dans l'hippocampe. La transmission chimique se déroule en plusieurs grandes étapes partagées par les différentes synapses chimiques :

- Synthèse du neurotransmetteur dans l'élément présynaptique,
- Stockage du neurotransmetteur dans le bouton présynaptique,
- Libération par exocytose du neurotransmetteur dans la fente synaptique (espace séparant l'élément pré- et postsynaptique).
- Fixation du neurotransmetteur sur ses récepteurs spécifiques au niveau de l'élément postsynaptique. Il est possible de trouver ces récepteurs sur l'élément présynaptique (rétroaction) ou en dehors de la fente (cellules gliales).
- Fin de la transmission synaptique par recapture du neurotransmetteur (dopamine, norépinephrine, glutamate et GABA), par dégradation (acétylcholine) ou assimilation et métabolisation par les cellules gliales (glutamate).

Les récepteurs spécifiques ont différentes propriétés. Ils peuvent être **métabotropiques** ou **ionotropiques**. Les récepteurs **métabotropiques** sont indirectement liés aux canaux ioniques présents sur la surface de la cellule par le biais d'une transduction du signal impliquant le plus souvent une protéine G. Leurs effets sont plus durables dans le temps et peuvent affecter une plus grande partie de la cellule.

D'un autre côté, les récepteurs **ionotropiques** s'activent plus rapidement que les recepteurs **métabotropiques**. Leurs effets durent moins longtemps et agissent sur une région limitrophe de leurs récepteurs. Il s'agit de récepteurs perméables aux ions, leur permettant de traverser la membrane de la cellule en réponse à la fixation d'un neurotransmetteur. Ces « récepteurs-canaux » vont, lors du contact du neurotransmetteur, changer de conformation, ouvrant le passage à un ou plusieurs ions différents. Ce mouvement ionique va modifier le potentiel de la membrane du neurone postsynaptique. Ainsi, une dépolarisation de la membrane va se traduire par une excitation du neurone, ou à l'inverse, une hyperpolarisation par une inhibition du neurone.

3.1.2 Modulateurs de la plasticité

La transmission rapide d'informations au sein des synapses chimiques passe principalement, au sein du SNC, par le glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) sur lesquels nous nous concentrerons dans cette partie. Le glutamate est le plus souvent responsable d'un message excitateur (neurones excitateurs) tandis que le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus répandu (neurones inhibiteurs).

a) Le glutamate

Une fois libéré dans la fente synaptique, le glutamate va se fixer sur ses récepteurs spécifiques. Il en existe quatre de nature ionotropiques (nommés AMPA, NMDA, Kainate et *delta*), et huit de nature métabotropiques (mGluR1 à 8) qui sont répartis en trois groupes (I, II et III) en fonction de la structure de leur récepteur et de leurs effets physiologiques. Les récepteurs ionotropiques servent à la fois de récepteurs pour le ligand, le glutamate, mais également de canal ionique activé par la fixation du ligand. Ces récepteurs portent le nom des agonistes qui ont été utilisés pour mettre en évidence leur activation (à l'exception des récepteurs *delta*). Ainsi, l'on retrouve les récepteurs AMPA, sensibles à l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique, les récepteurs NMDA, activés par le N-méthyl-D-aspartate, les récepteurs Kaïnate, activés par le kaïnate et enfin les récepteurs delta qui ne peuvent pas se lier au glutamate mais qui semble pouvoir se lier à la glycine et la D-sérine (Lomeli *et al.*, 1993; Naur *et al.*, 2007). Ces récepteurs ionotropiques sont composés de quatre sous-unités formant un canal ionique dans la membrane. Cette structure tétramérique a besoin pour fonctionner que ses sous-unités appartiennent à la même classe (AMPA, NMDA, Kaïnate ou *delta*).

Les récepteurs de type Kaïnate possèdent cinq sous-unités nommés GluK1 à 5. Ils sont perméables aux ions Na^+, K^+ et Ca^{2+}. Leur rôle n'est pas correctement déterminé mais ils reçoivent de la part de la communauté scientifique de plus en plus d'attention. Ils auraient une implication dans la régulation des interneurones GABAergique au sein de l'aire CA1 (Carta *et al.*, 2014) et joueraient un rôle dans la régulation de la libération du glutamate dans cette même zone (Valbuena and Lerma, 2020). De la même manière, les récepteurs *delta* sont composés de deux différentes sous-unités GluD1 et GluD2. Leur rôle fonctionnel reste encore à définir mais ils pourraient interagir avec le récepteur métabotropique du glutamate de type mGlu5 dans l'hippocampe et permettre son bon fonctionnement (Suryavanshi *et al.*, 2016).

Les récepteurs de type AMPA possèdent quatre différentes sous-unités (GluA1 à 4) se rassemblant par paire. Ils peuvent former soit des homomères (récepteurs composés uniquement de la même sous-unité), soit des hétéromères (récepteurs composés d'un mixte de sous-unités). Les récepteurs AMPA sont principalement perméables aux ions Na^+ et K^+ mais également aux ions Ca^{2+} s'ils ne sont pas composés de la sous-unité GluA2. De ce fait, ils peuvent jouer un rôle dans les mécanismes calcium-dépendant. Ils ont un temps d'activation

et de désactivation court et présentent une rapide et forte désensibilisation, un état pendant lequel le canal reste fermé malgré la liaison des ligands. Ces récepteurs sont connus pour jouer un rôle dans les phénomènes de plasticité au niveau de l'hippocampe (Lee and Huganir, 2007).

Pour finir, les récepteurs de type NMDA, les plus complexes, possèdent 7 sous-unités différentes. Tout d'abord, la sous-unité GluN1 existe sous 8 isoformes (1a à 4a, 1b à 4b) et forme le pilier du récepteur puisque l'homodimère GluN1 est obligatoire pour former un récepteur NMDA fonctionnel. C'est également cet homodimère qui va permettre la fixation des ligands co-agonistes tel que la glysine. Ensuite, les sous-unité GluN2A, 2B, 2C et 2D vont donner aux récepteurs NMDA leurs propriétés particulières, qu'il s'agisse de perméabilité et de conductance ionique, ou encore de mobilité membranaire. Ce sont les sous-unités GluN2 qui portent le site de fixation du glutamate. Au cours du développement, la composition des récepteurs NMDA en GluN2 va varier. À l'état embryonnaire, chez le rat, seuls les sous-unités GluN2B et GluN2D sont exprimées. Ensuite, pendant les 2 premières semaines postnatales, l'expression des GluN2A commence à augmenter jusqu'à devenir la sous-unité la plus largement exprimée dans tout le SNC à l'âge adulte. Pendant cette période, le taux d'expression de GluN2D chute tandis que celui de GluN2B se maintient à un haut niveau après la naissance dans tout le SNC avant de se voir peu à peu restreint au cerveau antérieur. Enfin, GluN2C voit son expression principalement cantonner au niveau du cervelet et du bulbe olfactif. Ce changement de constitution des récepteurs NMDA se manifeste par une modification dans l'excitabilité de ces récepteurs. L'apparition progressive des formes GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2A/GluN2B va progressivement réduire la sensibilité des récepteurs NMDA au glutamate. En effet, les récepteurs NMDA constitués de GluN2A présentent une sensibilité au glutamate plus faible, mais également une plus grande probabilité d'ouverture et une cinétique plus rapide tandis que les hybrides GluN2A/GluN2B présenteraient des caractéristiques intermédiaires (Paoletti, Bellone and Zhou, 2013). Enfin, les sous-unités GluN3A et GluN3B sont moins connues mais l'expression de GluN3A est plus importante après la naissance et diminue progressivement dans le temps, tandis que GluN3B voit son expression augmenter dans le temps et, à l'âge adulte, est fortement exprimé au niveau des motoneurones. La présence des sous-unités GluN2B, GluN2D et GluN3A dans la période périnatale peut indiquer leur importance dans les processus de développement, suggérant leur implication dans de potentiels processus comme la synaptogénèse ou la maturation synaptique (Henson *et al.*, 2010; Pachernegg, Strutz-Seebohm and Hollmann,

2012). Chez l'adulte, ce sont les sous-unités GluN2A et GluN2B qui sont majoritaires au niveau de l'hippocampe, soulignant leur rôle central dans les phénomènes de plasticité et de fonctions synaptiques.

Concernant les récepteurs métabotropiques, ces derniers font partis de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Une fois lié au glutamate, le récepteur change de conformation et active la protéine G qui va moduler plusieurs unités effectrices comme par exemple des canaux ioniques. Ces récepteurs mGlu sont classés en trois groupes I, II et III. Le groupe I (mGluR1 et mGluR5) comporte des récepteurs qui sont le plus souvent localisés au niveau postsynaptique et relayent une information excitatrice en réponse à la fixation du glutamate. Au sein de l'hippocampe, ces récepteurs vont diminuer la conductance potassique activée par le Ca^{2+} qui, d'une manière générale, modère la fréquence de décharge des neurones. Au contraire, les récepteurs des groupes II et III sont souvent localisés au niveau présynaptique où ils vont réduire la libération du neurotransmetteur, agissant comme une boucle de rétrocontrôle négatif.

b) Le GABA

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est libéré par des neurones inhibiteurs. Il joue le rôle de ligand pour 3 types de récepteurs membranaires appelés $GABA_A$ et $GABA_C$ (récepteurs ionotropiques) et $GABA_B$ (récepteur métabotropique). Les récepteurs ionotropiques sont constitués de 5 sous-unités (pentamères). Ils prennent la forme de pores perméables aux ions Cl^-. Les récepteurs $GABA_A$ sont composés d'une combinaison de 5 sous-unités parmi dix-neuf différentes (α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, π, θ et ρ1-3). Au sein de l'hippocampe, les sous-unités α1, β2 et γ2 sont les plus exprimées (Weiner and Valenzuela, 2006). Ces récepteurs sont la cible de nombreux agents pharmacologiques mais la plupart ne se lient pas sur le site de fixation du récepteur en lui-même mais plutôt sur des sites qui permettent d'augmenter les propriétés du GABA sur le récepteur (on parle de modulation allostérique positive). On peut citer par exemple les benzodiazépines et les barbituriques, molécules utilisées pour leurs propriétés sédatives, anticonvulsives et anesthésiques. Plusieurs molécules endogènes agissent également sur les $GABA_A$ comme les neurostéroïdes, les hormones sexuelles et les corticostéroïdes. Les récepteurs $GABA_C$ sont également des récepteurs canaux

pentamériques. Leur nom est historique puisqu'il s'agit d'une sous-classe de récepteurs $GABA_A$ appelés « $GABA_A$ sous-famille ρ » (Shimada, Cutting and Uhl, 1992). Ces récepteurs, comme leur nom l'indique, ne sont constitués que de sous-unité rho et ne répondent pas aux modulateurs des récepteurs type $GABA_A$. Ils sont pour la plupart retrouvés dans la rétine. Enfin, les récepteurs $GABA_B$ sont des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G qui se composent de deux sous-unités ($GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$). On les retrouve sur les éléments pré- et postsynaptique où ils assurent des fonctions différentes. Sur l'élément présynaptique, ils vont inhiber les canaux calciques et donc réduire l'influx de Ca^{2+} et avec lui la libération de vésicules contenant le GABA. Au niveau postsynaptique, ils ouvrent des canaux K^+ qui sont responsables d'une lente hyperpolarisation et, par ce fait, réduisent l'excitabilité des neurones (Froestl, 2011; Gassmann and Bettler, 2012).

3.2 La potentialisation à long terme

La PLT au sein de l'hippocampe résulte en une augmentation des connexions entre deux neurones, permettant d'obtenir un système plus excitable à certaines stimulations. Il s'agit d'un des deux phénomènes de plasticité synaptique supposé responsable de la mise en mémoire auquel l'on va s'intéresser dans cette partie.

3.2.1 Découverte de la potentialisation :

Ce phénomène fut la première fois observée chez le vivant par Bliss et Lomo en 1973. Leurs travaux consistaient à stimuler, chez le lapin anesthésié, les fibres de la voie perforante de l'hippocampe et à enregistrer les potentiels de champs et les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) qu'ils déclenchaient au niveau des cellules granulaires du gyrus denté. Ils ont mesuré à la suite d'un protocole de stimulation haute fréquence (15 stimulations par seconde, pendant 15 secondes) une augmentation de la réponse des neurones sous la forme d'une augmentation de l'amplitude des PPSEs et des potentiels de champs, et ce plusieurs heures après la fin du protocole de stimulation. Ils ont ainsi pu mettre en évidence le postulat de Hebb lors d'un enregistrement *in vivo*. Ils donnèrent à l'augmentation de l'activité

synaptique le nom de « *Long Term Potentiation* » ou Potentialisation à Long Terme (PLT) en français (Figure 8) (Bliss and Lømo, 1973).

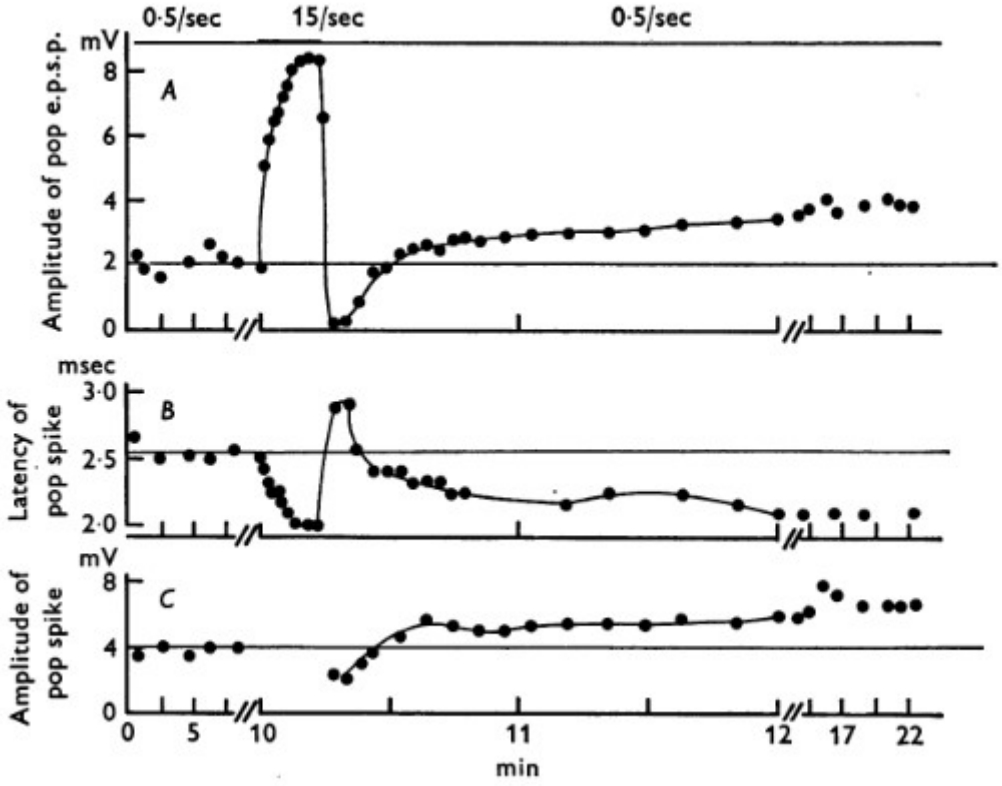


Figure 8: Résultats de l'expérience de Bliss et Lomo dans leur article de 1973

En haut (A) représentant l'amplitude du PPSEs en fonction du temps à différentes échelles. Entre 10 et 12 min est représenté l'enregistrement des 15 secondes du protocole de stimulaire suivi de 1 min 45 post-protocole. On observe une augmentation de la réponse du signal à la suite du protocole de stimulation par rapport à la ligne de base représentée par le trait noir à 2mV. De la même manière, pareille observation est possible sur l'enregistrement du bas (C), représentant l'amplitude du potentiel de champs en fonction du temps.

(Bliss and Lømo, 1973)

3.2.2 Les mécanismes de la potentialisation à long terme dépendante des récepteurs NMDA

La PLT est très probablement l'un des substrats neurobiologiques de la mise en mémoire et de nombreuses études ont cherché à explorer ses mécanismes. Son induction peut être faite de différentes façons, électriques ou chimiques, mais c'est surtout l'induction mettant en scène le récepteur NMDA que l'on retrouve au niveau de l'hippocampe (Collingridge, Kehl and McLennan, 1983). Au repos, les stimulations que vont recevoir les neurones vont induire une faible libération de glutamate qui va se fixer sur des récepteurs NMDA et AMPA (pour ne citer que les plus importants). Le glutamate va permettre l'ouverture des récepteurs AMPA et NMDA, mais ces derniers sont bloqués par les ions Mg^{2+} ambients lorsque l'élément postsynaptique est au potentiel de repos, rendant les récepteurs NMDA fonctionnellement inactifs. On parle de blocage voltage-dépendant. L'élément postsynaptique doit donc être dépolarisé, via les AMPA, pour lever cette inhibition des ions Mg^{2+} permettant l'entrée d'ions Ca^{2+} à l'intérieur de l'élément postsynaptique au travers des récepteurs NMDA. Cette étape est cruciale dans l'induction de la PLT puisqu'il a été mis en évidence qu'un appauvrissement du milieu extracellulaire en ions Ca^{2+} bloque l'induction de la PLT (Lynch *et al.*, 1983). Cette entrée massive d'ions Ca^{2+} va permettre d'activer la calcium/calmoduline kinase II (CaMKII) (Lisman, Yasuda and Raghavachari, 2012). En une dizaine de secondes, l'activation de la CaMKII va produire une augmentation rapide du nombre de récepteurs AMPA au niveau de la membrane du neurone postsynaptique (Patterson, Szatmari and Yasuda, 2010). De plus, la CaMKII va directement phosphoryler les sous-unités des récepteurs AMPA, modifiant leurs propriétés. Ainsi, la protéine Ser831 de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA est phosphorylée par la CaMKII ce qui a pour conséquence une augmentation de la conductance du récepteur (Barria *et al.*, 1997).

Par la suite, le maintien de la PLT dans le temps, ou son expression, implique des phénomènes supplémentaires de synthèse protéique et de transcription génétique. La CaMKII va activer l'adénylate cyclase qui va permettre la formation d'AMP cyclique (AMPc) à partir d'ATP (Elliot *et al.*, 1989). À son tour l'AMPc va permettre l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette PKA va par la suite se déplacer jusque dans le noyau pour phosphoryler et activer le facteur de transcription CREB (*Cyclic AMP Response-Element Binding*). Cette phosphorylation de CREB a été mise en évidence dans des neurones de l'aire CA1 après

l'induction de la PLT (Deisseroth, Bito and Tsien, 1996) et semble particulièrement importante pour le maintien de la PLT à long terme puisque son blocage chez une souche de souris mutée permet de sévèrement atteindre la mémoire à long terme ainsi que le maintien de la PLT, tout en gardant une induction normale (Bourtchuladze *et al.*, 1994). Un autre acteur important dans le maintien de la PLT est la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Cette dernière est également induite par l'activation de la PKA qui permet l'association de Rap-1 et B-Raf, des protéines cytosoliques impliquées dans la transduction des signaux cellulaires, aboutissant à la phosphorylation de MEK, kinase de la voie MAPK, qui va entrainer la phosphorylation de MAPK (Vossler *et al.*, 1997). Une fois activé, MAPK va permettre la transcription de 2 cibles principales : CREB et Elk-1, signifiant *E-twenty-six like-1*, un activateur de transcription, que l'on retrouve augmentés en réponse à l'induction d'une PLT (Bozon *et al.*, 2003). Pour une meilleure compréhension de ces phénomènes, nous invitons le lecteur à se référer à la figure 9. Le maintien de la PLT passe également par des modifications morphologiques importantes des synapses (croissance de nouvelles épines dendritiques, élargissement des épines existantes, augmentation de leur densité) possibles par une synthèse protéique accrue (Abraham and Williams, 2003; Corera, Doucet and Fon, 2009; Bosch *et al.*, 2014), ce qui traduit une plasticité d'ordre stucturelle.

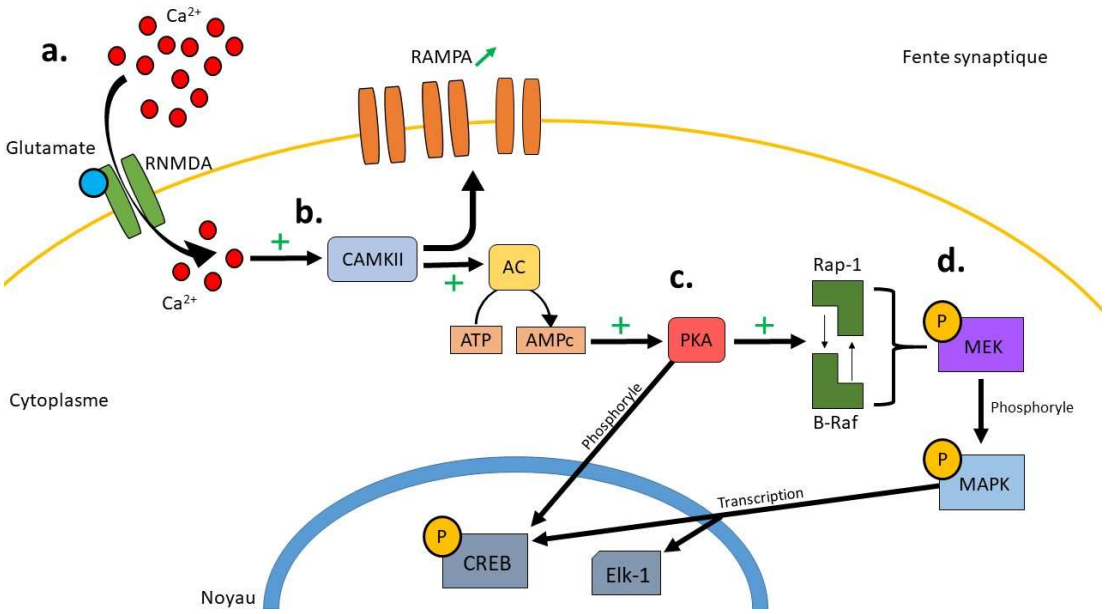


Figure 9: Représentation simplifiée des voies de signalisation se déroulant pendant l'induction et le maintien de la PLT.

a.) *Après une stimulation, l'ouverture des canaux NMDA induit par la fixation du glutamate et la dépolarisation de la synapse va provoquer l'entrée de Ca^{2+} dans l'élément postsynaptique qui va activer la CAMKII.* ***b.)*** *La CAMKII permet une augmentation rapide du nombre de RAMPA au niveau de la fente synaptique et va activer l'adénylate cyclase (AC) permettant la formation d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc va activer les PKA.* ***c.)*** *Les PKA vont phosphoryler le CREB dans le noyau, mais également permettre l'association de Rap-1 et B-Raf qui vont phosphoryler MEK.* ***d.)*** *MEK va à son tour phosphoryler MAPK qui va permettre la transcription de CREB et de Elk-1.*

Rabiant K.

Pour finir, la facilité avec laquelle la PLT est induite diminue avec l'âge. Il a été montré chez des modèles murins que les paradigmes d'induction de la PLT utilisés chez les jeunes animaux sont moins efficaces chez les animaux âgés (Foster *et al.*, 1991) et sont associés avec un déficit dans l'apprentissage spatiale. Ce dernier n'est pas lié à une perte de cellules ou de synapses dans le CA1 de l'hippocampe même si on retrouve une diminution de la densité de l'épine dendritique postsynaptique (Burke and Barnes, 2006). Il a également été mis en évidence récemment que ce changement impliquait les influx calciques. Une étude de Pereda et collaborateurs a montré qu'en diminuant la concentration extracellulaire de Ca^{2+} il était possible de récupérer une induction normale de la PLT chez des souris SyG37, souche de souris transgénique exprimant un senseur de Ca^{2+} au niveau de l'élément présynaptique, et qu'à

l'inverse, une augmentation de Ca^{2+} extracellulaire mimait les effets sur la PLT observés dans des tranches d'hippocampes issues de souris âgées (Pereda *et al.*, 2019). Il est intéressant de noter également qu'avec l'âge, si l'induction de la PLT est plus difficile, on observe une facilitation de l'induction du second type de plasticité appelé dépression à long terme (DLT) (Norris, Korol and Foster, 1996).

3.3 La dépression à long terme

Si la PLT permet d'augmenter la réponse des neurones à une stimulation donnée, la DLT a pour effet de diminuer de manière durable la transmission entre deux neurones. C'est le phénomène complémentaire de la PLT, également nécessaire dans les processus de mémorisation.

3.3.1 Découverte de la dépression à long terme

Après la découverte de la PLT, une nouvelle question se posa. Si le postulat proposé par Hebb dans son ouvrage couvrait l'augmentation d'une transmission entre les neurones, il n'avait pas évoqué la possibilité inverse de pouvoir réduire cette communication. Puisqu'il n'est pas possible de stocker une infinité de nouvelles informations dans le cerveau, ce qui nécessiteraient des capacités de plasticité sans limite dans un modèle physiologique, il devait exister un moyen « d'effacer » des informations. C'est à partir de ce constat que Stent émit la théorie complémentaire à celle de Hebb en 1973. Cette théorie reprend la démonstration de Hebb en changeant son sens de la manière suivante : « *Quand l'axone présynaptique de la cellule A échoue de manière persistante et répétée à exciter la cellule postsynaptique B pendant qu'elle décharge sous l'influence d'autres axones présynaptiques, des changements métaboliques prennent place dans l'une ou les deux cellules de telle manière à ce que l'efficacité de la cellule A, comme déclencheur de la cellule B, soit diminuée.* » (Stent, 1973). De fait, peu de temps après la découverte de la PLT, la DLT a été observée. L'une des premières études à mettre en évidence une dépression durable de la transmission neuronale à la suite d'une stimulation a été faite par l'équipe de Lynch en 1977. Cette étude démontra qu'une stimulation induisant une PLT sur les synapses excitées, induisait également une

dépression réversible des synapses non tétanisées, au niveau de l'aire CA1 *in vitro* (Lynch, Dunwiddie and Gribkoff, 1977). Ce phénomène est appelé dépression hétérosynaptique et fut démontré par la suite *in vivo* dans le gyrus denté (Levy and Steward, 1979). Des études ont pu mettre en évidence que des stimulations répétées à basse fréquence (1Hz) induisent une DLT hétérosynaptique tandis que des stimulations hautes fréquences répétées (15 à 100Hz) induisent plutôt une PLT sur des tranches *ex vivo* d'hippocampe de rats adultes (Dunwiddie and Lynch, 1978), et le même constat a été fait dans le gyrus denté (Bramham and Srebro, 1987). À l'inverse, la dépression dite homosynaptique, c'est-à-dire seulement induite dans les synapses recevant le protocole d'induction, a été décrite la première fois lorsqu'un protocole de stimulation basse fréquence (1 Hz pendant 100 secondes) inversa une PLT stable (Barrionuevo, Schottler and Lynch, 1980). Ce phénomène fut alors appelé dépotentiation.

Les premières études de DLT homosynaptique sur des synapses naïves, donc sans induction de PLT au préalable, ont été réalisées dans le cervelet de lapin en 1982 par l'équipe de Ito. Il a été montré par la suite dans l'hippocampe, au niveau de la région CA1, qu'une stimulation basse fréquence permet d'induire une DLT, *in vitro*, et qui dépendait du récepteur NMDA (Figure 10) (Dudek and Bear, 1992; Mulkey and Malenka, 1992). Ce type de plasticité a été mis en évidence dans de nombreuses autres structures telles que le cortex visuel, le striatum, le cortex périrhinal, l'amygdale, et les cortex préfrontal et cingulaire postérieur (pour revue voir (Massey and Bashir, 2007)). On peut également noter que la notion de haute et basse fréquence dépend beaucoup des modèles animaux utilisés, de leurs âges, mais également des synapses étudiées si bien qu'un même protocole appliqué sur 2 synapses différentes pourra avoir des résultats opposés. Ceci montre une forte similitude dans les mécanismes d'induction de la PLT et de la DLT.

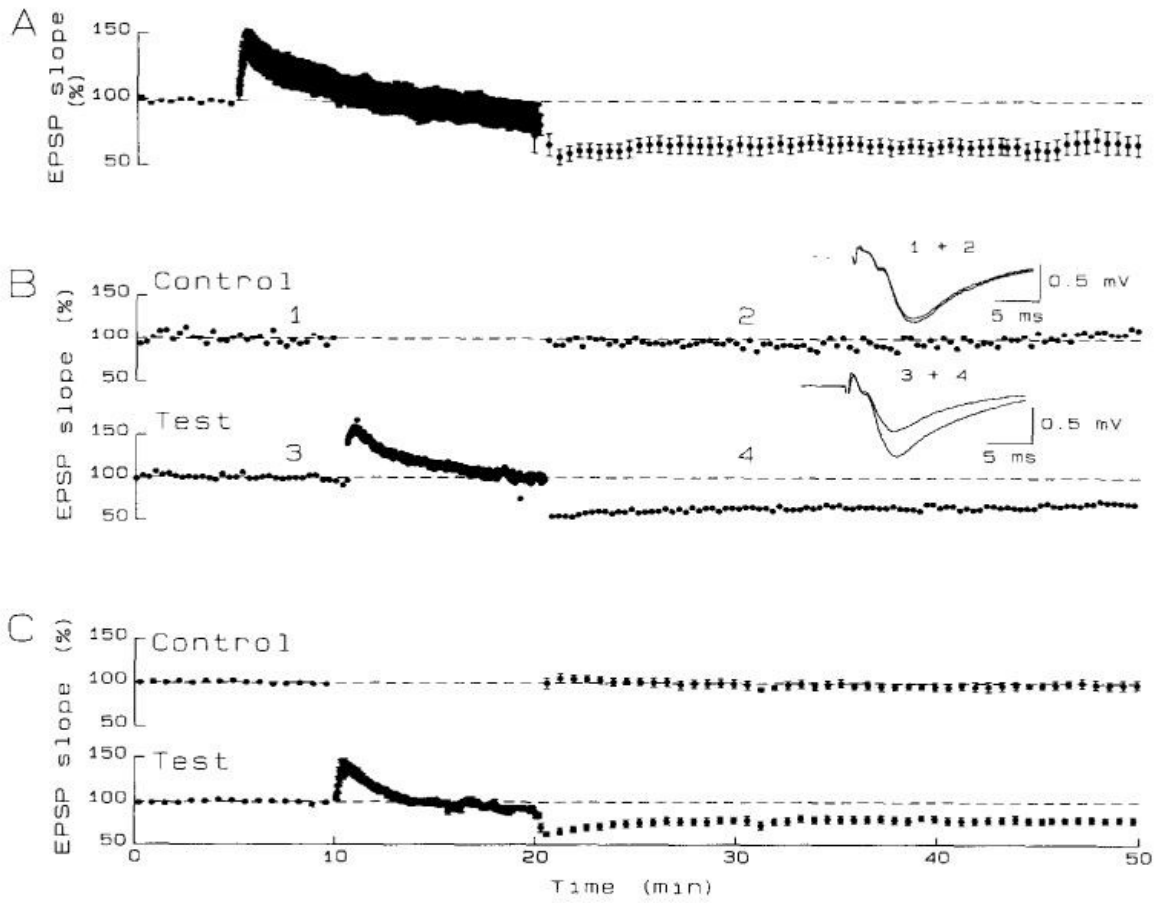


Figure 10: : Dépression à long terme (DLT) dans l'hippocampe issu de l'article de Mulkey et Malenka en 1992.

Une stimulation basse fréquence (1Hz pendant 900 secondes) au niveau des collatérales de Schaffer induit une DLT au niveau de l'aire CA1 lors d'un enregistrement au niveau du stratum radiatum. ***A)*** *Représentation de l'expérience sur 7 animaux, on observe une DLT d'une valeur de 36% par rapport à la ligne de base.* ***B)*** *Enregistrement unitaire de 2 fibres de la même tranche, « test » recevant la stimulation. On observe le déclenchement de la DLT à la suite de la stimulation.* ***C)*** *Enregistrement moyenné de 5 animaux avec une diminution de la DLT de 21%*

(Mulkey and Malenka, 1992)

3.3.2 Les mécanismes de la dépression à long terme dépendante des récepteurs NMDA

Différentes formes de DLT existent, mais nous ne détaillerons que la DLT dépendante des récepteurs NMDA. Rapidement, la seconde forme principale de DLT est celle dépendante des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR). Au sein de l'hippocampe, on peut trouver ce dernier type de DLT à la suite d'une stimulation électrique ou chimique, avec des agonistes des mGluR de type 1, qui engendrerait une endocytose des récepteurs AMPA (pour revue voir (Gierski *et al.*, 2017b)), mécanisme final que nous retrouvons dans la DLT dépendante des récepteurs NMDA. Dans ce cas, l'induction de la plasticité est dictée par l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée des ions Ca^{2+}. Toutefois, l'entrée de Ca^{2+} sera plus modérée, comparée à celle nécessaire à l'induction de la PLT. Cette concentration plus faible, va permettre d'activer des phosphatases, la calcineurine (qui dépend du complexe calcium/calmoduline) qui va pouvoir déphosphoryler la protéine I1 (inhibitor 1) qui régule la phosphatase PP1 (Mulkey and Malenka, 1992). En outre, on va noter une activation de la phosphatase PP2A (Mulkey, Herron and Malenka, 1993). C'est l'augmentation de PP1 qui va permettre une déphosphorylation de la CaMKII aboutissant à l'induction de la DLT.

L'expression de la DLT dépendante des récepteurs NMDA va impliquer plusieurs mécanismes, notamment de diminution, voire d'élimination de certains éléments aux niveaux pré- et postsynaptique. Il a été montré qu'une diminution de la probabilité de libération du glutamate par l'élément présynaptique contribuait à l'expression d'une DLT (Stanton *et al.*, 2003). Cependant, la plupart des formes majeures de DLT, incluant celle dépendante des récepteurs NMDA, impliquent des modifications de l'élément postsynaptique, à savoir une diminution des récepteurs AMPA à la surface de la membrane (Huganir and Nicoll, 2013). Cette diminution passe par un retrait de ces récepteurs (Collingridge, Isaac and Yu, 2004) ou par la diminution de leur conductance ou de leur sensibilité au glutamate (Lüthi *et al.*, 2004). Les récepteurs AMPA sont retirés de la densité postsynaptique permettant alors leur diffusion en dehors de la synapse ou leur internalisation par des phénomènes d'endocytoses cellulaires (Shepherd and Huganir, 2007). La déphosphorylation rapide et persistante des acteurs impliqués dans la PLT, notamment la sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA, les rend moins efficaces, et contribue à la mise en place d'une DLT (Lee *et al.*, 1998; Banke *et al.*, 2000) et provoque l'internalisation de ces récepteurs (Malenka and Nicoll, 1997).

Pour comprendre ces mécanismes, nous pouvons faire appel au fonctionnement de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA. Cette sous-unité peut être phosphorylée par différentes protéines telles que la PKA, la PKC (Tan, Wenthold and Soderling, 1994) et la CaMKII (Barria *et al.*, 1997), que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, et à des sites spécifiques de son extrémité C-terminale. D'un côté, la PKA phosphoryle la sérine 845 (S845) tandis que la PKC et la CaMKII phosphorylent la sérine 831 (S831). Ceci est intéressant car c'est peut être l'un des mécanismes responsables de l'orientation de la plasticité puisqu'on observe dans une PLT une phosphorylation de S831 sans atteinte de S845 (Barria *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000). D'un autre côté, la DLT est associée à une déphosphorylation de S845, sans atteinte de S831 (Lee *et al.*, 1998, 2000). De plus, il a été montré que, chez des souris *knock-in* pour les sérines 845 et 831 remplacées par une alanine, le blocage de ces sérines permet d'abolir la DLT au niveau de CA1 (Lee *et al.*, 2003, 2010) soulignant l'importance de la phosphorylation de GluA1 par les PKA même si les récepteurs seront éventuellement déphosphorylés (Huganir and Nicoll, 2013). Au niveau de l'hippocampe, les taux de récepteurs AMPA perméables au calcium (RAMPA-PC), contenant la sous-unité GluA1, sont faibles. Cependant le blocage de la recapture du glutamate dans la fente synaptique révèle une population de RAMPA-PC dans la région périsynaptique. Cette population disparait lors de la mutation de GluA1 S845A (He *et al.*, 2009). Ces récepteurs AMPA composés de la sous-unité GluA1 sont recrutés de manière transitoire au niveau de la synapse pendant l'induction de la DLT par le biais des PKA (Sanderson, Gorski and Dell'Acqua, 2016). Cette équipe a ainsi mis en évidence que pendant l'induction de la DLT, un signal transitoire des RAMPA-PC est nécessaire à l'expression complète de la DLT puis ces récepteurs vont eux même signaler leur propre internalisation par le biais de l'activation des calcineurines (CaN). Ainsi, sans phosphorylation de GluA1 par la PKA, le recrutement des RAMPA-PC n'est pas possible ce qui pourrait expliquer l'absence de DLT chez les souris *knock-out* pour la sérine GluA1 S845A.

Une autre protéine, la AKAP5, est également importante pour la DLT (Jurado, Biou and Malenka, 2010; Sanderson, Gorski and Dell'Acqua, 2016). Cette protéine d'échafaudage va lier PKA et CaN à la GluA1 permettant le bon déroulement des différentes étapes pendant la DLT (Sanderson and Dell'Acqua, 2011). Pendant les étapes d'induction de la DLT, on assiste également à l'internalisation des récepteurs AMPA par un système de clathrines et de dynamines (Lin *et al.*, 2000; Man *et al.*, 2000). Les récepteurs internalisés présentent également une déphosphorylation de la S845 (Ehlers, 2000) (Figure 11).

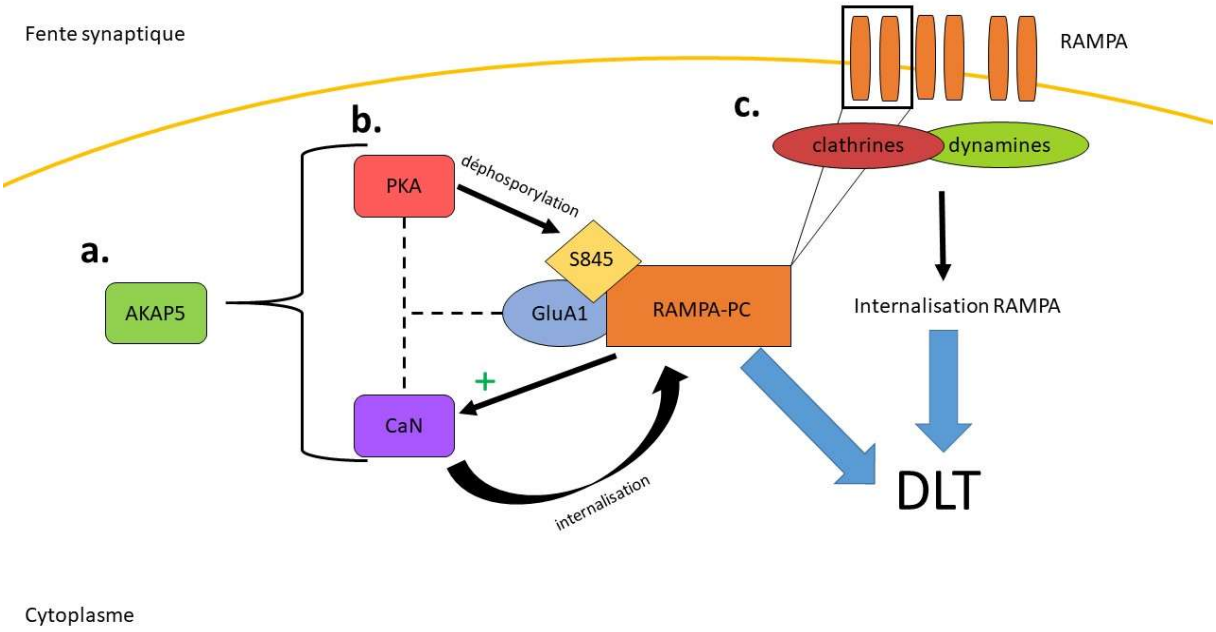


Figure 11: Représentation schématique de l'implication de GluA1 dans le maintien de la DLT.

***a.**) La protéine d'échafaudage AKAP5 va permettre de lier la PKA, la CaN et GluA1 contribuant au bon déroulement des phases de la DLT. **b.)** PKA déphosphoryle la sérine 845 (S845) de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA perméables au Ca^{2+} (RAMPA-PC) qui vont induire leur propre internalisation en activant la Calcineurine (CaN). **c.)** Les récepteurs AMPA présent à la surface de la synapse sont internalisés par un complexe clathrines/dynamines. Ces mécanismes contribuent au maintien de la DLT.*

Réalisé par Rabiant K.

La sous-unité GluA1 subit également une déphosphorylation de la tyrosine 840 (T840) par les phosphatases PP1/PP2A pendant la DLT, en plus de celle de la sérine 845 (Delgado *et al.*, 2007; Toda and Huganir, 2015; Sanderson, Gorski and Dell'Acqua, 2016). Dans des conditions basales, près de la moitié des GluA1 présentent une phosphorylation de T840 et une inhibition des PP1/PP2A conduit à une brusque élévation des taux de phosphorylation de T840, suggérant que ce site est capable de régulation rapide entre les différents états de phosphorylation (Lee *et al.*, 2007; Babiec, Guglietta and O'Dell, 2016). La phosphorylation de T840 augmente la conductance de GluA1 tandis que celle de S845 augmente la probabilité d'ouverture du canal. Ceci suggère qu'une déphosphorylation de ces sites peut être important dans l'expression de la DLT (Banke *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2014).

D'un autre côté, la sous-unité GluA2 joue le rôle du régulateur clé dans les phénomènes d'endocytose (Lee *et al.*, 2000). Les sous-unités GluA2 interagissent avec la protéine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), impliquée dans la fusion des vésicules dans la membrane. L'entrée de Ca^{2+} dans l'élément postsynaptique va entrainer l'activation d'une hippocalcine sensible aux légères variations de Ca^{2+} qui va pouvoir former un complexe avec la protéine AP2 (*Clathrin adaptator protein*), empêchant l'interaction entre les sous-unités GluA2 et NSF. Cette interaction va induire l'internalisation des récepteurs AMPA (Palmer *et al.*, 2005). Certains peptides, comme le Pep2-SVKI, préviennent la DLT induite par une stimulation basse fréquence en bloquant cette interaction (Daw *et al.*, 2000).
La phosphorylation de GluA2 est également importante puisqu'une phosphorylation de la sérine 880 (S880) est nécessaire pour induire une DLT dans le cervelet. En effet, l'utilisation de souris *knock-out* à la sérine 880 bloque l'induction de la DLT chez ces animaux (Hee Jung Chung *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2006). Cet effet de la S880 passe par la régulation de l'interaction entre GluA2 et les protéines contenant un domaine PDZ (*post-synaptic density*) GRIP1/GRIP2 et PICK1 qui régulent le trafic des récepteurs AMPA. Leur délétion entraine un blocage de la DLT dans le cervelet (Steinberg *et al.*, 2006; Takamiya *et al.*, 2008).

Au niveau de l'hippocampe, de nombreuses études montrent l'importance de la phosphorylation de S880 dans la DLT (Hee Jung Chung *et al.*, 2000; Seidenman *et al.*, 2003; Steinberg *et al.*, 2006). Cela renforce le modèle selon lequel GRIP1/GRIP2 se lie directement au domaine C-terminal de GluA2 permettant la fixation du récepteur à la densité postsynaptique (Anggono and Huganir, 2012). En effet, la phosphorylation de S880 va empêcher la liaison de GRIP1/GRIP2 et va promouvoir l'interaction entre le domaine PDZ de GluA2 et PICK1 (Hee Jung Chung *et al.*, 2000; Seidenman *et al.*, 2003; Steinberg *et al.*, 2006) ce qui va déstabiliser la place de GluA2 au niveau de la synapse et faciliter son endocytose. Ainsi, PICK1 peut soit induire une invagination de la membrane plasmique, soit rediriger GluA2 vers une région où se déroulent les endocytoses induites par les clathrines (Xia *et al.*, 2000; Fiuza *et al.*, 2017) (Figure 12).

De plus, la phosphorylation de la tyrosine des GluA2 est également impliquée dans les mécanismes de la DLT. GluA2 et GluA3 possèdent un domaine C-terminal contenant un cluster de tyrosine dans laquelle se trouve la tyrosine Y876, identifiée comme étant une cible des

tyrosine-kinases Src (Hayashi and Huganir, 2004). Les agonistes du récepteur au glutamate incluant le glutamate, le NMDA et l'AMPA induisent une phosphorylation des tyrosines de GluA2 perturbant l'interaction entre GluA2 et GRIP1/GRIP2 mais pas PICK1 (Hayashi and Huganir, 2004). Plusieurs études ont montré qu'un traitement avec un petit peptide (appelé 3Y) mimant la région tyrosine de GluA2 bloque entièrement la DLT et l'endocytose des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2, à la fois sur tranche et dans des modèles *in vivo* (Ahmadian *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2007), mais sans avoir d'effet sur la transmission basale. Enfin, il a récemment été mis en évidence l'importance de l'extrémité C-terminale de GluA2. En effet, en remplaçant cette extrémité par celle de GluA1 (mutant GluA2^{C1K1}), on obtient une abolition de la DLT dépendante des récepteurs NMDA. De plus, un double mutant GluA2^{C1K1}/GluA1^{C2K1} permet de récupérer une DLT normale montrant ainsi que l'extrémité C-terminale de GluA2 est nécessaire et suffisante pour l'induction de la DLT dépendante des récepteurs NMDA dans l'hippocampe (Zhou *et al.*, 2018).

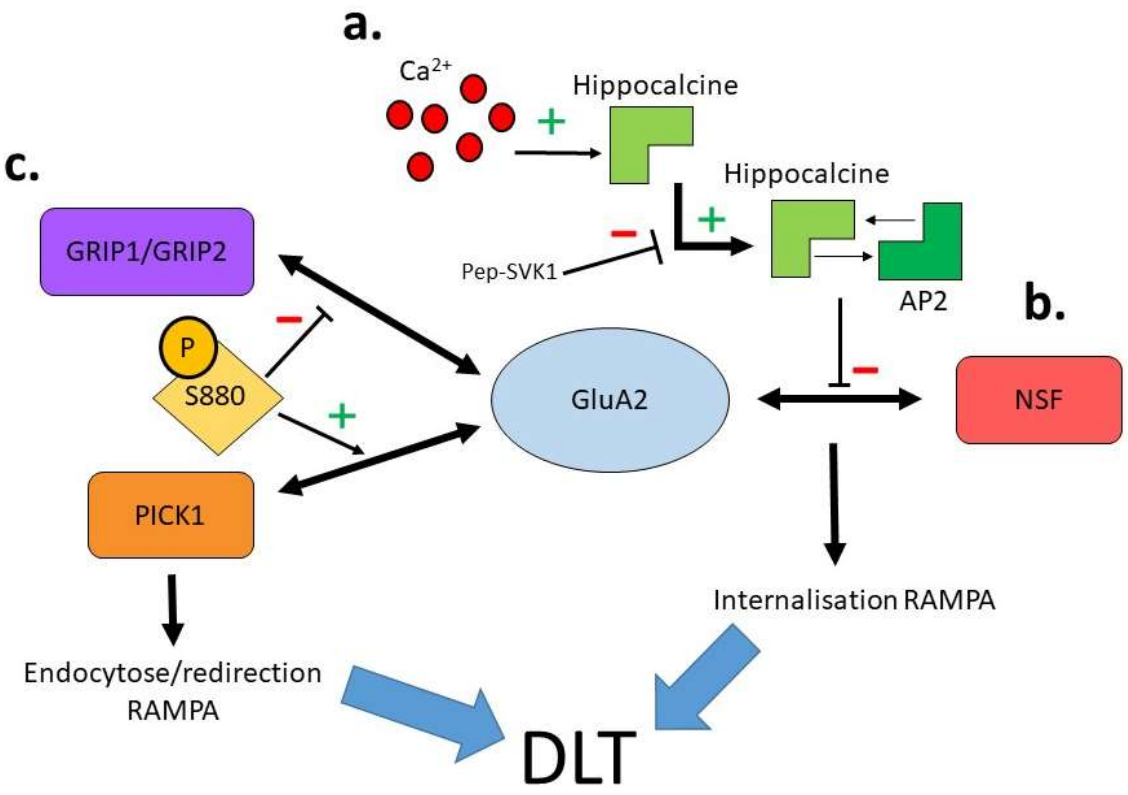


Figure 12: Représentation schématique de l'implication de GluA2 dans le maintien de la DLT.

a.) *L'entrée de Ca^{2+} va activer l'hippocalcine qui va stimuler la formation d'un complexe avec l'AP2. Le peptide Pep-SVKI bloque cette interaction.* ***b.)*** *À l'état de repos, GluA2 et NSF interagissent. Le complexe AP2-hippocalcine va perturber cette interaction et va induire une internalisation des RAMPA aboutissant au maintien de la DLT.* ***c.)*** *L'extrémité C-terminale de GluA2 peut se fixer avec GRIP1/GRIP2 mais également PICK1 contenant un domaine PDZ. La phosphorylation de la sérine 880 (S880) va bloquer la liaison de GRIP1/GRIP2 avec GluA2 et va promouvoir la fixation de PICK1, entrainant une déstabilisation de GluA2 au niveau de la synapse, induisant une endocytose ou une redirection des RAMPA vers une zone d'invagination cytoplasmique. Ces mécanismes facilitent le maintien de la DLT.*

Réalisé par Rabiant K.

Les récepteurs AMPA ne sont toutefois pas les seuls acteurs dans l'orientation de la plasticité, et les récepteurs NMDA eux-mêmes peuvent faire pencher la balance en faveur d'une PLT ou d'une DLT. Pour rappel, une des formes de la DLT au niveau de CA1 dans l'hippocampe a été démontrée comme étant dépendante des récepteurs NMDA (Dudek and Bear, 1992; Mulkey and Malenka, 1992) et l'application de NMDA seule permet d'induire une DLT ressemblant à celle induite par un protocole de stimulation basse fréquence (Lee *et al.*,

1998). Ce rôle a également été mis en évidence *in vivo* (Thiels, Barrionuevo and Berger, 1994; Heynen, Abraham and Bear, 1996; Manahan-Vaughan, 1997). Il est également intéressant de souligner qu'avec l'âge certaines formes de DLT sont plus difficiles à obtenir au niveau de l'hippocampe. Ainsi, un protocole de stimulation induisant une DLT dépendante des récepteurs NMDA chez le rat juvénile va provoquer une DLT indépendante des récepteurs NMDA chez le rat adulte (Kemp *et al.*, 2000). Ce changement a été mis en parallèle de la modification de la composition en sous-unité des récepteurs NMDA avec l'âge (Insel, Miller and Gelhard, 1990; Monyer *et al.*, 1994; Okabe *et al.*, 1998). Ainsi, on observe une transition d'une sous-unité GluN2B majoritaire pendant la période juvénile vers une majorité de sous-unités GluN2A chez des animaux adultes (Liu, Murray and Jones, 2004). Son importance est également mise en évidence par l'utilisation d'antagonistes. Par exemple, un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B bloque l'induction de la DLT chez le rat jeune adolescent (Liu, Murray and Jones, 2004) mais également chez les rats prépubères (P14/21) (France *et al.*, 2017). *In vivo*, l'utilisation de Ro25-6981, un antagoniste de la sous-unité GluN2B, bloque la DLT avec peu d'effet sur la PLT à la suite d'une injection i.p. ou intrahippocampique (i.h.) (Fox *et al.*, 2007). De la même manière, l'utilisation d'un antagoniste GluN2B va détériorer la mémoire spatiale chez des rats, alors qu'aucun effet n'est observé avec un antagoniste GluN2A (Ge *et al.*, 2010). De plus, des protocoles de stimulation normalement inefficaces chez le rat adulte sont capables d'induire une DLT lorsque le système de recapture du glutamate est inhibé (Massey *et al.*, 2004). À l'aide de manipulations génétiques, il a été mis en évidence chez des rats *knock-out* au GluN2B (Brigman *et al.*, 2010) mais également *knock-out* au gène KIF 17 qui aboutit à une diminution de GluN2B synaptique (Yin *et al.*, 2011), une détérioration de la DLT chez ces animaux, soulignant l'implication de cette sous-unité dans ce type de plasticité.

Cependant, le rôle du GluN2B dans l'induction de la DLT est critiqué par une partie de la communauté scientifique. En effet, la surexpression de la sous-unité GluN2B a montré une facilitation de la PLT mais aucun effet sur la DLT, suggérant que la sous-unité n'a pas d'impact sur la DLT (Tang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2009). De plus, chez le rat adulte, il a été montré que l'amplitude de la DLT est augmentée en présence aigüe d'éthanol dans le bain mais également d'ifenprodil, un antagoniste de la sous-unité GluN2B (Hendricson *et al.*, 2002) supposant alors que la sous-unité possède des propriétés inhibitrices sur la DLT. Enfin, l'équipe de Morishita a mesuré que la sous-unité n'était pas impliquée dans la DLT en utilisant deux

antagonistes différents (l'ifenprodil et la Ro25-6981) qui provoquaient une augmentation de l'amplitude de la DLT (Morishita *et al.*, 2007).

Ainsi, le rôle des sous-unités du récepteur NMDA dans la plasticité est encore sujet à débat (pour revue voir (Shipton and Paulsen, 2014)) encore aujourd'hui puisqu'il a récemment été montré l'absence d'implication des deux sous-unités dans la DLT à l'aide d'un modèle de rats jeunes (P14/21), mâles et femelles, dans des enregistrements de plasticité de neurones isolés provenant d'animaux génétiquement modifiés (Wong and Gray, 2018). Cependant, l'utilisation de différents protocoles expérimentaux et modèles animaux pourraient être la cause de ces désaccords au sein de la communauté scientifique.

3.4 Éthanol, mémoire, plasticité et adolescence

Comme présenté plus tôt dans ce manuscrit, la maturation du cerveau n'est pas terminée pendant l'adolescence des mammifères, aussi il s'agit d'une période critique dans le développement et la maturation de la circuiterie cérébrale où la toxicité de l'éthanol peut causer des atteintes sur le long-terme. Chez l'Homme il s'agit également de la période où commencent le plus souvent les consommations d'alcool, aussi il est nécessaire d'en comprendre les conséquences.

Lorsqu'on compare les effets d'une dose d'alcool 30 min avant un test de performance via le MWM entre des rats adultes et des rats adolescents, on observe une atteinte des performances lors de la phase d'acquisition et pendant la phase de test des animaux adolescents mais pas des rats adultes (Markwiese *et al.*, 1998). Ce test est un dispositif circulaire contenant de l'eau opaque dans lequel le rongeur est placé. Une plateforme est dissimulée sous la surface de l'eau et le rat doit nager pour trouver et grimper sur cette plateforme le plus rapidement possible. Il s'agit d'un test interrogeant les capacités de mémoire spatiale (principalement liée à l'hippocampe) du rongeur puisque la plateforme ne change pas de position, seul le départ de l'animal est modifié. Dans cette étude, les résultats obtenus suggèrent que les adolescents sont plus vulnérables aux atteintes hippocampiques induites par l'alcool que les rats adultes. Dans une autre étude, Sircar et Sircar montrent qu'une administration aigüe d'éthanol provoque une atteinte des performances lors d'un test de MWM chez des rats adultes et adolescents. Cependant, les atteintes de l'hippocampe durent 25 jours pour les adolescents contrairement aux adultes pour lesquels on observe un

retour à la normal après 4 jours (Sircar and Sircar, 2005). De la même manière, la sensibilité accrue des rats adolescents par rapport aux adultes serait expliquée par leur échec plus important dans des tests de mémoire spatiale ainsi que par l'effet inhibiteur de l'éthanol plus important sur les récepteurs NMDA des adolescents comparés aux adultes (White and Swartzwelder, 2004). De plus, il a été montré chez des rattes adolescentes et des rattes adultes une atteinte des performances cognitives pendant la phase d'acquisition du MWM tandis que seules les femelles adolescentes présentaient une baisse des performances cognitives lors de la phase de test (Sircar, Basak and Sircar, 2009). On retrouve cette différence au niveau de la plasticité synaptique. En 1999, l'équipe de Pyapali a observé que l'éthanol abolissait la PLT dépendante des récepteurs NMDA avec des doses de 10 à 30mM chez des rats mâles de 30 jours tandis que ces doses n'ont aucun effet sur les rats de 90 jours (Pyapali *et al.*, 1999). Suggérant ainsi que les adolescents sont plus sensibles aux effets inhibiteurs de l'éthanol sur les récepteurs NMDA. Ces résultats, pris dans leur globalité, renforcent l'hypothèse selon laquelle les populations jeunes et adolescentes sont plus vulnérables aux atteintes de l'hippocampe induites par l'éthanol.

Un facteur aggravant est également présent puisque la population adolescente favorise l'alcoolisation ponctuelle importante comme mode de consommation d'alcool. Ce type de consommation provoque des atteintes variées au niveau des fonctions du SNC qui peuvent durer dans le temps (Merrill and Carey, 2016; Tapia-Rojas *et al.*, 2018). L'une de nos précédentes études a montré les effets d'un faible nombre d'intoxication sur la plasticité de l'hippocampe. Nous avions observé qu'une seule injection d'éthanol (3g/kg, v/v) ne permettait pas d'induire d'atteinte de la plasticité au niveau de CA1 chez le rat mâle adolescent 24h ou 48h après le traitement. Cependant, 2 injections séparées de 9h suffisent à induire une abolition durable de la DLT 48h après le traitement accompagnée par une atteinte des capacités cognitives lors d'un test de reconnaissance du nouvel objet (Novel Object Reconnaissance Task – NOR task) (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). Ce test consiste à placer le rat dans une boite contenant 2 objets (A et B) pendant la phase d'acquisition puis, lors du test, l'un des 2 objets est remplacé par un nouveau (C) et l'on mesure le temps que passe le rat sur le nouvel objet, témoin de son apprentissage (Figure 13 ; (Bevins and Besheer, 2006)). Ce test explore les capacités d'acquisition nécessitant la DLT dans l'hippocampe (Ge *et al.*, 2010). De plus, l'implication de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA est suggérée par une étude de notre laboratoire montrant que la modulation de la balance des sous-unité

GluN2A/GluN2B, en faveur d'une augmentation de GluN2B pourrait être la cause de l'abolition de la DLT après 2 injections d'éthanol (Drissi *et al.*, 2020). Cette abolition passerait tout d'abord par l'augmentation des taux d'ARN messagers de la sous-unité GluN2B par l'éthanol, mais également par l'histone déacétylase 2 (HDAC2) qui est également surexpérimé grâce aux effets de l'éthanol.

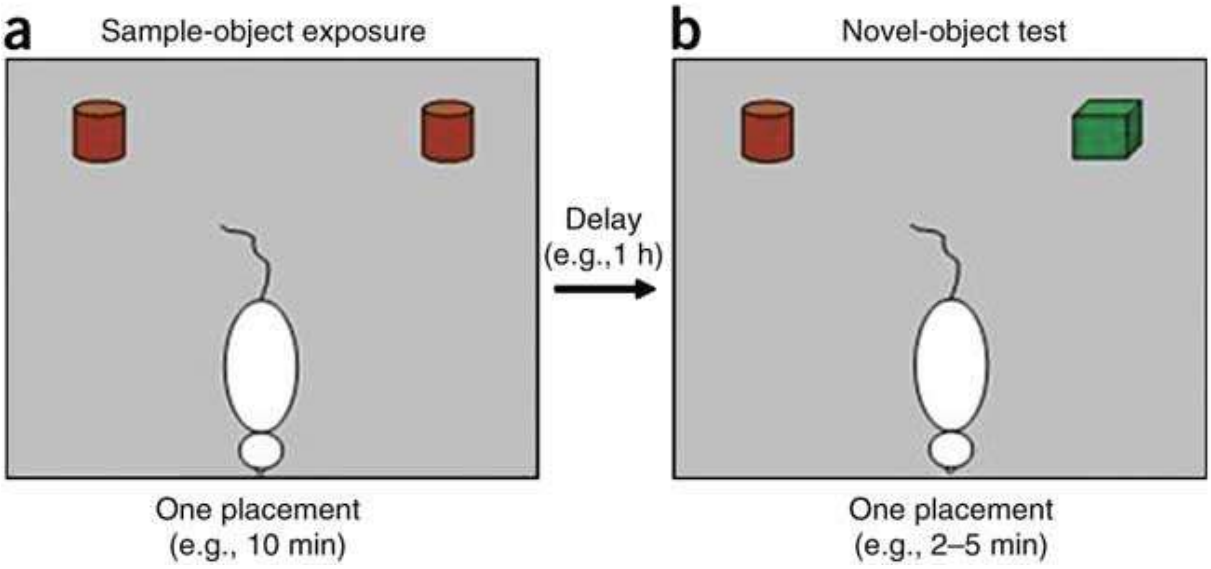


Figure 13: Représentation d'un test de Reconnaissance du Nouvel Objet (NOR).

A) *L'animal est placé dans une boite contenant 2 objets A et B. L'expérimentateur mesure le temps que passe le rat sur chaque objet.* ***B)*** *Après une période choisie, l'animal est replacé dans la même boîte contenant l'objet A et un nouvel objet C. L'expérimentateur mesure ensuite le temps que le rat passe sur le nouvel objet.*

(Bevins and Besheer, 2006)

D'un autre côté, des cycles répétés d'alcoolisations ponctuelles importantes avec un protocole d'exposition 2 jours « on », 2 jours « off » (8 injections i.p. au total) provoquent des altérations de l'apprentissage et des capacités de mémoire accompagnées par une atteinte de la plasticité synaptique chez le jeune rat mâle pouvant durer jusqu'à 7 jours après le dernier traitement (Tapia-Rojas *et al.*, 2018). Dans un modèle de *binge drinking* (3 jours « on », 4 jours « off » en gavage) chez la femelle adolescente, on retrouve des pertubations similaires se prolongeant jusqu'à 14 jours de sevrage (Fernandes *et al.*, 2018). De manière intéressante, des résultats contraires ont été trouvés lors de l'utilisation de chambres d'inhalation. La mise

en contact avec des vapeurs d'alcool 10h/jour pendant 3 jours sur 4 semaines montrent une absence d'atteinte cognitive lors d'un test de MWM (Schulteis *et al.*, 2008). De la même manière, un traitement de 16h/jour pendant 4 jours ne montre aucune altération des capacités mnésiques (Van Skike *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que ces protocoles d'exposition à l'éthanol n'ont pas de répercussion sur les fonctions de l'hippocampe, contrairement aux exemples cités plus haut. Ces différences peuvent être liées aux voies d'administrations de l'alcool, au temps nécessaire pour atteindre un taux d'alcoolisation suffisamment élevé dans le sang ainsi que la valeur maximale de l'éthanolémie atteinte avec ces différents protocoles.

À un niveau structurel, les alcoolisations importantes chez les rats produisent une augmentation du nombre d'épines immatures accompagnée d'une réduction du nombre d'épines matures chez les neurones pyramidaux de CA1 (Risher *et al.*, 2015). Cette réduction du nombre d'épines ainsi que cette diminution de leur état de maturation concordent avec une transmission excitatrice plus faible dans l'hippocampe. Les neurones granulaires dans l'hippocampe dorsal montrent également une réduction de la densité de leurs épines dendritiques chez les rats adultes soumis à une exposition intermittente à l'éthanol pendant l'adolescence. De plus, une réduction des épines en forme de champignons (« *mushroom* ») ainsi que des épines longues et fines (« *long thin* ») est observée chez ces rats (Mulholland *et al.*, 2018). Ces résultats indiquent que l'exposition à l'éthanol pendant l'adolescence altère la structure des terminaisons dendritiques, et que ces modifications persistent jusqu'à l'âge adulte.

Concernant maintenant les propriétés électrophysiologiques des neurones, chez le rat mature il faut une forte concentration d'éthanol (100mM) pour produire une diminution de l'amplitude des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE), tandis que chez le rat immature on observe un changement dose-dépendant commençant dès 10mM (Swartzwelder, Wilson and Tayyeb, 1995). De plus, les courants transmembranaires liés aux récepteurs NMDA sont inhibés par l'éthanol de manière dose-dépendante (entre 10-50mM) sur des tranches d'hippocampe de rats proches de la puberté (21-26 jours) tandis que chez les rats nouveau-nés les courants ne sont inhibés qu'à une plus forte concentration (75mM) (Mameli *et al.*, 2005). Comme la composition en sous-unité des récepteurs NMDA change pendant le

développement, il est fort probable que cela affecte la réponse de l'hippocampe aux effets de l'éthanol. Cependant, des études ont mis en évidence que la sous-unité GluN2B de la membrane extra-synaptique régule un plus grand nombre de protéines que la sous-unité GluN2B présente au sein de la synapse chez le rat adulte ayant subi une exposition intermittente à l'éthanol pendant l'adolescence (Swartzwelder *et al.*, 2016). Chez la souris, une exposition chronique et intermittente à l'éthanol altère l'interaction entre GluN2B et des protéines importantes dans la DLT dépendante des récepteurs métabotropiques du glutamate (Wills *et al.*, 2015), soulignant un mécanisme d'atteinte cognitive provoqué par la consommation d'alcool pendant l'adolescence.

De plus, les effets observés de l'éthanol semblent être dépendants de la vitesse à laquelle la concentration d'alcool augmente dans le corps. Il a été observé, via l'enregistrement des potentiels de champs postsynaptiques excitateurs dans la région CA1, que 60mM d'EtOH bloque l'induction de la PLT. Cependant, lorsque l'éthanol est incrémenté par palier de 10mM toutes les 15min jusqu'à atteindre 60mM, ce blocage de la PLT n'apparait pas, indiquant potentiellement une tolérance qui se met en place après un contact avec l'éthanol à faible concentration. Cette tolérance semble être liée aux altérations des stocks intracellulaires de calcium et/ou aux fonctions des récepteurs métabotropiques du glutamate (Tokuda, Zorumski and Izumi, 2007), ajoutant alors un nouveau niveau de complexité dans les effets de l'éthanol sur les fonctions hippocampiques puisque plus l'augmentation de la concentration d'éthanol dans le sang est rapide, plus le blocage de l'induction de la PLT semble être important.

Si nous nous intéressons à la survivabilité cellulaire, nous constatons que des intoxications de type *binge* chez des rats adolescents diminuent la neurogénèse et provoquent la mort cellulaire potentiellement par nécrose. Une comparaison des noyaux pycnotiques (condensation irréversible de la chromatine dans le noyau des cellules mourantes) par le test TUNEL, permettant de détecter la fragmentation apoptotique de l'ADN utilisée pour quantifier la mort cellulaire, met en évidence un faible pourcentage de cellules positives (Morris, Eaves, *et al.*, 2010). En étudiant le marqueur DCX (Doublecortin), un marqueur de la migration cellulaire, les chercheurs ont observé une diminution de son immunoréactivité 4 jours après un traitement de type *binge drinking*, après 2 jours de sevrage, mais pas après 7 jours de sevrage, indiquant une récupération des effets délétères causés par l'éthanol après une période d'abstinence. Après 28 jours de sevrage, les auteurs ont mesuré une réduction du

nombre de cellules positive à la BrdU, un marqueur du renouvellement tissulaire, indiquant ainsi une diminution de la survivabilité des cellules après une exposition à l'éthanol pendant l'adolescence chez le rat (Morris, Kelso, *et al.*, 2010). Néanmoins, il a également été rapporté que des injections i.p. d'éthanol (2g/kg ; v/v) pendant 3 jours chez le rat adolescent augmentent le nombre de cellules positives lors d'un test TUNEL et le nombre de cellules pycnotiques (Jang *et al.*, 2002) suggérant donc une mort neuronale par apoptose. Ces études montrent que l'éthanol pendant l'adolescence semble induire une mort cellulaire. Cependant le type de mort cellulaire, nécrose ou apoptose, est encore incertain.

Ainsi de nombreuses études montrent des effets délétères de l'éthanol sur les fonctions cognitives et l'apprentissage, que ce soit chez un modèle animal adulte ou adolescent. Malgré la myriade de modèles expérimentaux utilisés pour modéliser une alcoolisation importante, il apparait une sensibilité plus importante des individus pendant la période de l'adolescence. Cependant, et même si nombres d'études commencent à s'y intéresser, la différence des genres n'est que peu aborder dans l'évaluation des effets d'un faible nombre d'intoxications fortes sur la plasticité pendant cette période de vulnérabilité qui voit apparaître de nouveaux acteurs capables de moduler la plasticité de l'hippocampe : les hormones sexuelles, et plus particulièrement les œstrogènes.

Les œstrogènes

Lorsqu'on s'intéresse aux principales différences entre les mâles et les femelles, il est important de s'intéresser aux rôles physiologiques que pourraient avoir les hormones sexuelles. Différences majeures entre les sexes, ces hormones marquent également chez les individus l'entrée dans la puberté et elles sont la source d'un grand nombre de bouleversements physiologiques chez les mâles comme chez les femelles. Dans cette partie nous allons aborder les spécificités de ces hormones ostrogéniques et s'intéresser à leurs implications dans la plasticité.

1. Rappel sur la découverte du principe de sécrétion hormonale

La genèse des recherches sur les hormones est attribuée à Claude Bernard, l'un des pères de la médecine expérimentale. Dans son ouvrage de 1865 intitulé « *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* », il présente sa méthodologie partant de l'observation jusqu'à l'expérimentation. Claude Bernard développe également le concept de sécrétion interne en observant le relargage de glucose par le foie et son transport dans le sang. Cette observation donne naissance à de nombreuses études sur la sécrétion endocrine, en organisant les études autour de 3 étapes expérimentales principales :

1- Extraction de la glande avec enregistrement des signes et des symptômes observés ;
2- Réimplantation de la glande dans le corps en observant, ou non, un retour à la normale ;
3- Administration de l'extrait de la glande aux patients ne possédant pas la glande et observer une disparition des symptômes.

Dans le cas de l'étude du rôle des ovaires, la réalisation de ces étapes a mis plusieurs années. Tout d'abord dans les années 1870, ce qui pourrait correspondre à la première étape listée ci-dessus serait les travaux de Robert Battey qui développe l'ovariectomie chirurgicale chez la femme (Battey, 1873). Cette opération de Battey devint populaire et servit à traiter les dysménorrhées ainsi que les saignements du myomata. Cependant, après ovariectomie, les patientes étaient sujettes à des bouffées de chaleur importantes ainsi qu'à une atrophie vaginale. Ensuite, la seconde étape pourrait être représentée par les travaux de Emil Knauer, un gynécologue viennois, qui en 1896, parvint à enlever les ovaires d'un lapin et à observer une atrophie de l'utérus qu'il pouvait prévenir en réimplantant les ovaires, confirmant leurs capacités de sécrétion (Knauer, 1898). Enfin, la dernière étape pourrait se rapporter aux travaux réalisés en 1897 par Hubert Fosbery qui utilisa de l'extrait ovarien pour traiter une patiente souffrant de bouffées de chaleur importantes. Dans son article, Fosbery détailla les symptômes et expliqua que sa prescription d'extrait ovarien calma les épisodes de bouffées de chaleur après 2 semaines de traitements. Sa description fut convaincante bien qu'à postériori elle puisse être attribuée à un effet placebo (Fosbery, 1897). Toutefois, il devint évident dès lors que les ovaires sécrètent une substance circulante dans le corps et dont l'absence engendre des effets néfastes sur l'organisme. Il faudra cependant attendre 1929 pour que les œstrogènes soient isolés grâce au travail combiné d'Edgar Allen et d'Edward Doisy. En parallèle, un autre chercheur du nom de Adolf Butenandt réussit à purifier et à cristalliser l'estrone, une hormone de la famille des œstrogènes, ce qui lui vaudra le prix Nobel de chimie en 1939.

2. Généralités sur les œstrogènes

2.1 La synthèse œstrogénique

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes participant au second système de communication au sein de l'organisme, le système hormonal, permettant aux différentes cellules de notre corps de transmettre des informations et de s'adapter à leur milieu. La grande famille des hormones stéroïdiennes rassemble des molécules composées d'une structure perhydrocyclopentaphénantrénique (noyau stérane, Figure 14) composé de quatre cycles notés de A à D.

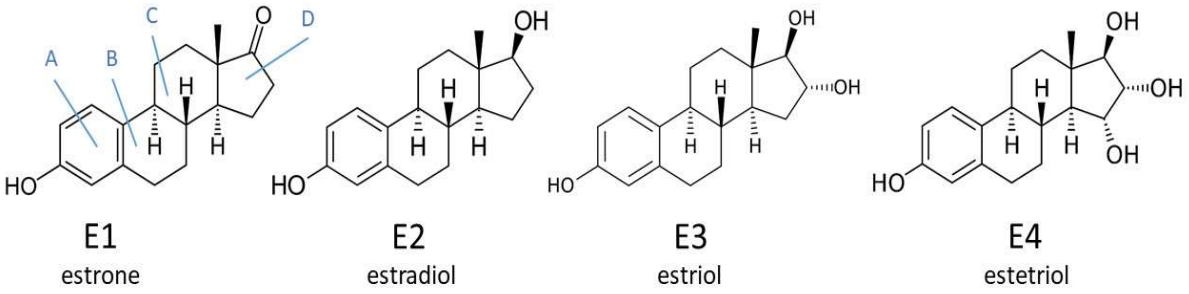


Figure 14: Formules semi-développée des différentes molécules d'œstrogènes.

Adapté de (Häggström and Richfield, 2014) par Rabiant K.

Le composé précurseur de ces hormones est le cholestérol. Il va permettre de former les hormones stéroïdes sexuelles telles que la progestérone, les androgènes et les œstrogènes, mais également les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les acides et sels biliaires ainsi que la vitamine D3 appelée cholécalciphérol. Les sites de production de ces hormones changent en fonction des espèces, des sexes et des hormones. Par exemple, pour les œstrogènes, le cholestérol est transformé dans les ovaires. Après activation par l'hormone lutéinisante (LH), les ovaires vont transformer le cholestérol en testostérone après une série d'actions enzymatique impliquant des hydroxylases et des déshydrogénases. Après la stimulation par l'hormone folliculo-stimulante (FSH), la testostérone est alors aromatisée (par une enzyme appelée aromatase) en différentes isoformes d'œstrogènes dont l'estradiol dans les cellules de la *granulosa* des follicules en croissance (Häggström and Richfield, 2014). De faibles quantités d'œstrogènes sont également produites par les glandes surrénales et par

d'autres cellules du corps telles que les neurones (Simpson *et al.*, 2002). Il existe 4 formes d'œstrogènes:

- L'estrone ou E1, est un œstrogène à faible activité, présent en petite quantité dans le corps. Sa principale fonction est de servir de métabolite intermédiaire dans la synthèse de l'estradiol ou E2. Il a cependant une certaine efficacité thérapeutique chez les femmes ménopausées.
- L'estradiol ou E2 ou encore 17β-estradiol, est la forme la plus puissante et la plus présente dans le corps. C'est cette forme qui est responsable de la régulation du cycle ovarien et du développement des caractères sexuelles secondaires chez la femme. L'estradiol est également important dans le développement ainsi que la maintenance des tissus de l'utérus, du vagin et des glandes mammaires. Son rôle s'étend de la puberté jusqu'au début de la ménopause. On peut également noter qu'il a un effet chez les mâles, chez qui il est présent en petite quantité, synthétisé notamment par les testicules (Carreau, 2002) ;
- L'estriole ou E3, est un œstrogène également à faible activité et présent en petite quantité. Il n'est quantifiable que chez la femme enceinte puisqu'il est produit en grande quantité par le placenta (Strauss and Barbieri, 2013). Il peut être utilisé pour tester la présence d'une grossesse mais également comme traitement dans des thérapies hormonales contre les symptômes de la ménopause ;
- L'estétrole ou E4, le dernier type d'œstrogène qui n'est présent que chez la femme enceinte puisque produit en grande quantité par le foie du fœtus. Il est envisagé comme agent pharmacologique dans des thérapies hormonales pour soulager l'atrophie vaginale, les bouffées de chaleurs et la perte osseuse chez les femmes ménopausées, mais également comme traitement dans le cancer du sein, de la prostate, de l'arthrite osseuse et des migraines (Bennink, Holinka and Diczfalusy, 2008; Visser and Coelingh Bennink, 2009).

En ce qui concerne la production cérébrale d'œstrogènes, il a été mis en évidence la présence au sein de l'hippocampe d'une activité aromatase. L'expression ou la présence de l'ARN messager de l'aromatase a été retrouvé dans l'hippocampe de rongeurs, de singes mais également d'Humain dans plusieurs études (Sasano *et al.*, 1998; Hojo *et al.*, 2004; Prange-Kiel *et al.*, 2006; Ishunina, Fischer and Swaab, 2007; Yague *et al.*, 2008; Pietranera *et al.*, 2011;

Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016). Ces études soulignent donc un rôle des œstrogènes dans la physiologie fonctionnelle de l'hippocampe. Cet aspect n'a pas été abordé dans nos études et ne sera donc pas développer en détails dans la suite de ce manuscrit. Cependant, nous renvoyons le lecteur à la revue de Hojo qui propose une vue d'ensemble des effets des œstrogènes produits par l'hippocampe sur les processus de mémorisation (Hojo *et al.*, 2008).

2.2 Le cycle œstral

La synthèse des œstrogènes va dépendre à la fois du site de production de ces hormones mais également de l'état physiologique du sujet, qui change en fonction des différentes phases du cycle œstral par exemple. Pour la plupart des espèces incluant l'Homme, ce cycle œstral chez les femelles va se caractériser par la sécrétion cyclique des hormones sexuelles, à l'inverse des mâles qui possèdent une sécrétion de type « pulsatile » pour la testostérone. Ce dernier type de sécrétion permet une concentration sanguine plus stable au cours du temps. Concernant les œstrogènes, ces derniers sont sécrétés dans le sang en grande quantité lors de phases précises du cycle œstral. Chez l'être humain, ce cycle s'appelle le cycle menstruel et dure en moyenne 28 jours. Plus précisément, cette durée varie de 21 à 45 jours chez des jeunes femmes, et de 21 à 35 jours chez des adultes. Ces cycles se répètent de la puberté jusqu'à la ménopause, et s'arrêtent en cas grossesse. Chez la femme, le cycle menstruel peut être décrit de deux façons, selon le cycle ovarien ou selon le cycle utérin. Nous nous intéresserons au cycle ovarien qui se divise en 3 phases : la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale (Figure 15).

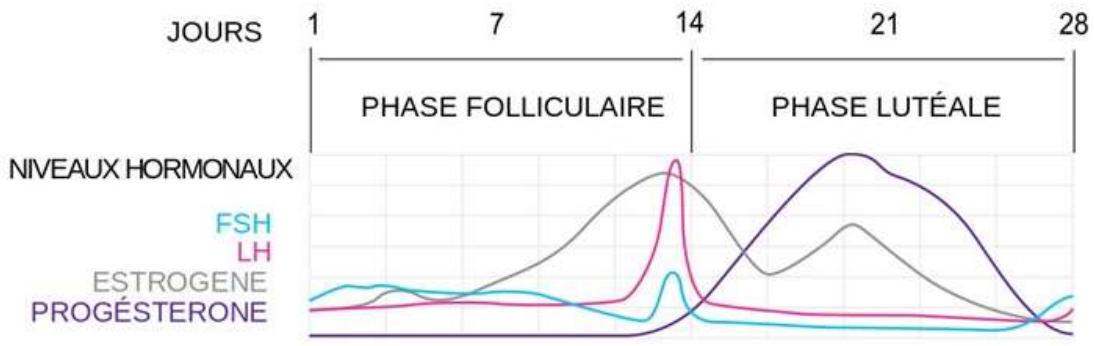


Figure 15: Représentation schématique des taux d'hormones pendant le cycle ovarien.

Extrait du site www.cngof.fr adapté par Rabiant K.

La **phase folliculaire** est la première de ce cycle qui dure approximativement 10 à 12 jours. Elle se traduit par une maturation de l'ovocyte en vue de la future ovulation. Pendant cette phase, la concentration d'estradiol augmente jusqu'à atteindre un pic vers le douzième jour. Pendant son augmentation, l'estradiol va inhiber la sécrétion de la LH (Hormone Lutéinisante) mais lorsqu'il va atteindre un seuil de concentration, l'estradiol va stimuler une production massive de LH permettant l'ovulation. Pendant cette phase folliculaire, la concentration de la progestérone est maintenue à un niveau faible.

Ensuite vient la phase d'**ovulation** (non représenté sur la Figure 15). Cette phase dure entre 2 et 4 jours en fonction des individus et survient vers le 12ème - 14ème jour du cycle ovarien. C'est au cours de cette phase que l'ovule mature quitte l'ovaire et descend dans l'utérus par les trompes de Fallope. Les concentrations d'estradiol vont alors diminuer rapidement et il en va de même pour la LH et la FSH (Hormone Folliculo-Stimulante).

Enfin, la **phase lutéale** est la troisième du cycle et dure entre 12 à 14 jours. Pendant cette phase, le corps jaune, formé temporairement dans l'ovaire après l'expulsion de l'ovule, va sécréter de la progestérone, préparant l'appareil génital à un nouveau cycle ovarien. L'augmentation de progestérone va stimuler la production d'estradiol dont la concentration va augmenter légèrement avant de diminuer en même temps que la concentration de progestérone. Cette diminution de concentrations va déclencher les menstruations qui ont donc lieu pendant la première phase du cycle utérin (phase folliculaire) et qui marque à la fois, la fin du cycle ovarien et le préparation du prochain cycle. Si la femme est enceinte, le corps jaune, est maintenu par l'ovule fertilisé ce qui empêche le cycle de s'achever et, ce qui maintient l'utérus dans un état physiologique permettant le développement de l'embryon. Dans ce cas, les menstruations n'ont pas lieu car le myomètre qui compose la paroie de l'utérus et sur lequel se fixe l'ovocyte fécondé, est maintenu dans son intégrité par la production hormonale.

Chez le rat, le cycle ovarien est différent, mais on retrouve ces phases d'augmentation et de diminution des concentrations des hormones sexuelles. Le cycle est appelé cycle œstral ou cycle de l'œstrus et dure en moyenne 4 jours. Il se divise en 4 phases que sont : le prœstrus,

l'œstrus, le metœstrus et le diœstrus. L'ovulation se produit au début du prœstrus et dure jusqu'à la fin de l'œstrus avec un pic d'E2 apparaissant au début de la phase de prœstrus (Ann Thomson – *The Physiology of Reproduction Vol. 2)*. Chez les rats, la femelle n'est sexuellement active que pendant l'œstrus, ce que l'on caractérise par l'état de « chaleurs » chez les animaux. Pendant la phase de prœstrus, un ou plusieurs follicules de l'ovaire commencent à grossir. Chez le rat, le prœstrus dure 1 jour et s'accompagne d'une augmentation de la concentration d'estradiol dans les premières heures de cette phase. Vient ensuite la phase de l'œstrus pendant laquelle la femelle devient sexuellement réceptive et montre un comportement de « chaleurs ». Dans le cas des rats, il est possible d'observer un changement de coloration au niveau du vagin, et un comportement de lordose lorsque la femelle est placée en présence d'un mâle. Les phases de diœstrus et de metœstrus sont caractérisées par une faible production hormonale et la préparation du prochain cycle œstral. Ainsi, chez le rat, la concentration d'œstrogènes est la plus forte pendant le prœstrus, puis elle va chuter pour atteindre son taux le plus bas pendant l'œstrus avant d'augmenter légèrement pendant les phases de metœstrus et de diœstrus, préparant le pic du prochain cycle (Figure 16 ; (Haim *et al.*, 2003)).

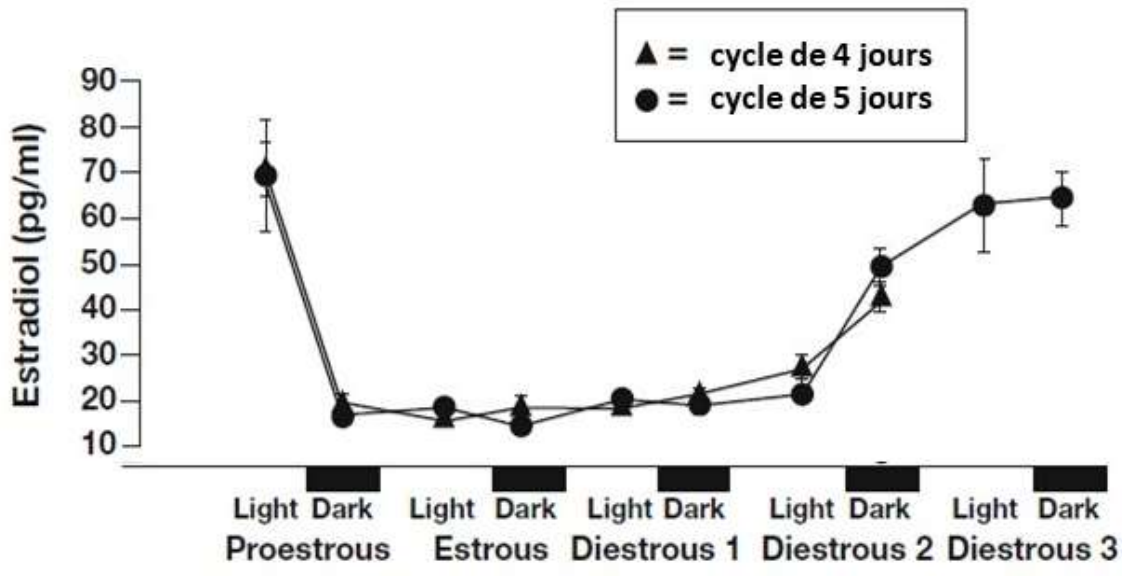


Figure 16: Taux d'estradiol (pg/mL) dans le sérum chez des femelles rats F344 pendant les différentes phases du cycle œstral.

Extrait de(Haim et al., 2003), adapté par Rabiant K.

Chez le rat, ces cycles peuvent être évalués de différentes façons, notamment à l'aide de frottis vagianux qui peuvent être soit colorés (par la technique de Papanicolaou) ou non (comptage cellulaire). La méthode employée dans notre étude, un comptage cellulaire sur état frais, est décrite dans le chapitre 4 : Matériels et Méthodes.

Ainsi, et malgré d'énormes différences temporelles, les cycles œstraux des mammifères possèdent plusieurs similitudes. C'est le cas entre la femme et la ratte qui présentent certaines similitudes temporelles et fonctionnelles du pic d'œstrogènes annonçant l'ovulation (Figure 17). Cette similitude permet de se pencher sur le rôle de ces phases sur des fonctions et des mécanismes physiologiques particuliers.

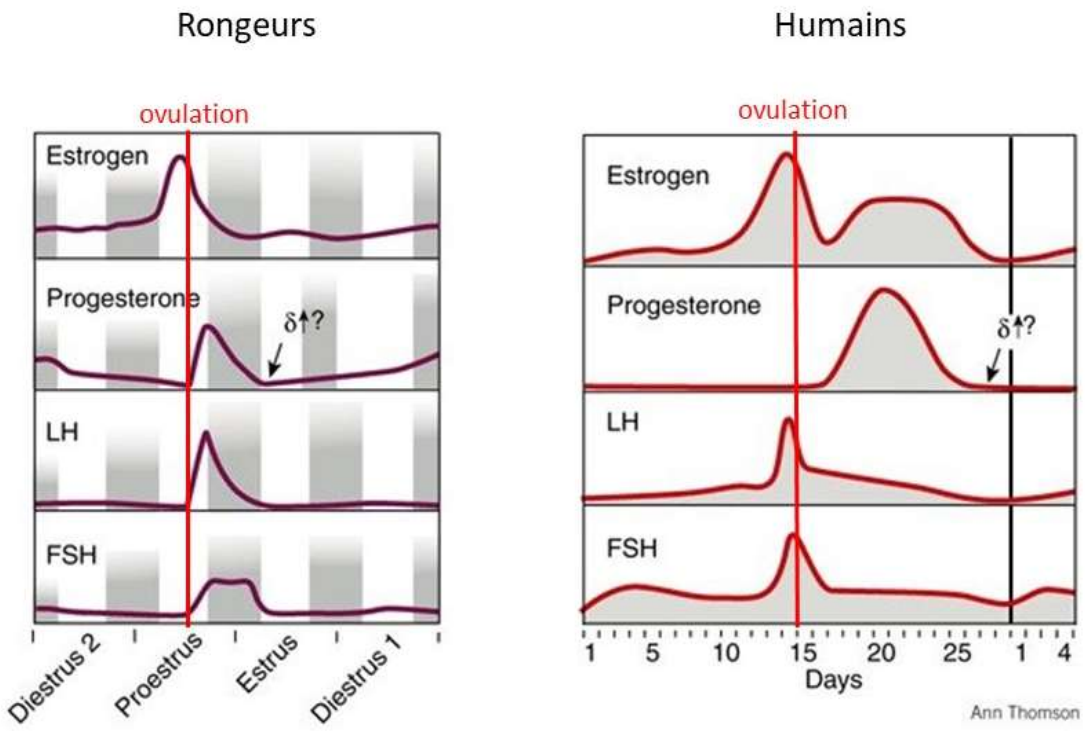


Figure 17: Comparaison du cycle de l'œstrus chez le rat et du cycle ovarien chez la femme.

Les rats présentent un cycle de 4 jours (les barres grises représentent la nuit) montrant des fluctuations d'œstrogènes proches de celles visibles chez la femme. La ligne rouge montre la moyenne du jour où se déclenche l'ovulation en fonction des espèces.

((Staley and Scharfman, 2005); adapté de Ann Thomson – The Physiology of Reproduction Vol. 2)

Des études ont montré chez les rongeurs que l'estradiol possédait des propriétés neurotrophiques en augmentant à la fois la synaptogénèse et en renforçant la structure de la glie au niveau de l'hippocampe (Barha and Galea, 2010). Chez l'Homme, une telle influence de l'estradiol sur la morphologie de l'hippocampe a été montrée notamment pendant la puberté puisqu'il s'agit d'une période de maturation importante pendant laquelle l'estradiol provoque une augmentation des volumes de l'hippocampe (Neufang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2013). De plus, une étude récente a montré un impact direct du cycle menstruel sur la morphologie de l'hippocampe. Les auteurs ont mesuré l'anisotropie fractionnelle, un indice quantifiant l'intégrité structurelle d'une région cérébrale, et observé une corrélation positive entre cet indice et le taux d'estradiol dans l'hippocampe de la femme, révélant une valeur maximale autour de la période d'ovulation, et donc, du pic d'estradiol endogène (Barth *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'estradiol possède la capacité de modifier la structure de l'hippocampe, et révèle également le caractère transitoire de cet effet qui apparait et disparait au rythme des phases du cycle ovarien.

2.3 Les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux ostéogènes (ER) sont des récepteurs nucléaires dont la fonction est l'activation de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation cellulaire et la reproduction. Le ligand de ces récepteurs est l'estradiol et ils existent sous 3 isoformes: ERα, ERβ et ERγ (aussi appelé ERαβ). Ce dernier n'a été identifié que chez certaines espèces de poissons (Hawkins *et al.*, 2000; Ma, Dong and Yu, 2000; Menuet *et al.*, 2002). Au niveau de l'hippocampe, ces récepteurs ERα et ERβ sont toutefois majoritairement non nucléaire et présents au niveau des épines dendritiques, des terminaisons présynaptiques et de la glie (Loy, Gerlach and McEwen, 1988). ERα et ERβ sont codés à partir des gènes ESR1 et ESR2, respectivement. Ces récepteurs partagent une structure similaire. Ils sont tous les deux composés de 6 domaines fonctionnellement distincts notés de A à F (Figure 18). Leur région N-terminale (domaine A/B) est hautement variable en taille et en homologie de séquences. On la retrouve impliquée dans les interactions avec les co-régulateurs pour contrôler la transcription. Ce domaine ne présente que 18% d'homologie entre les récepteurs ERα et ERβ et peut expliquer leur différence de réponse. Ensuite le domaine C, hautement conservé

(97%), est responsable de la fixation à l'ADN. Il est également impliqué dans la dimérisation des récepteurs nucléaires. Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E. Le domaine E sert de site de fixation au ligand et à un rôle important dans la dimérisation de ces récepteurs, la localisation nucléaire et l'interaction avec les co-régulateurs. Et enfin le domaine F forme la partie C-terminale (Kumar *et al.*, 1987).

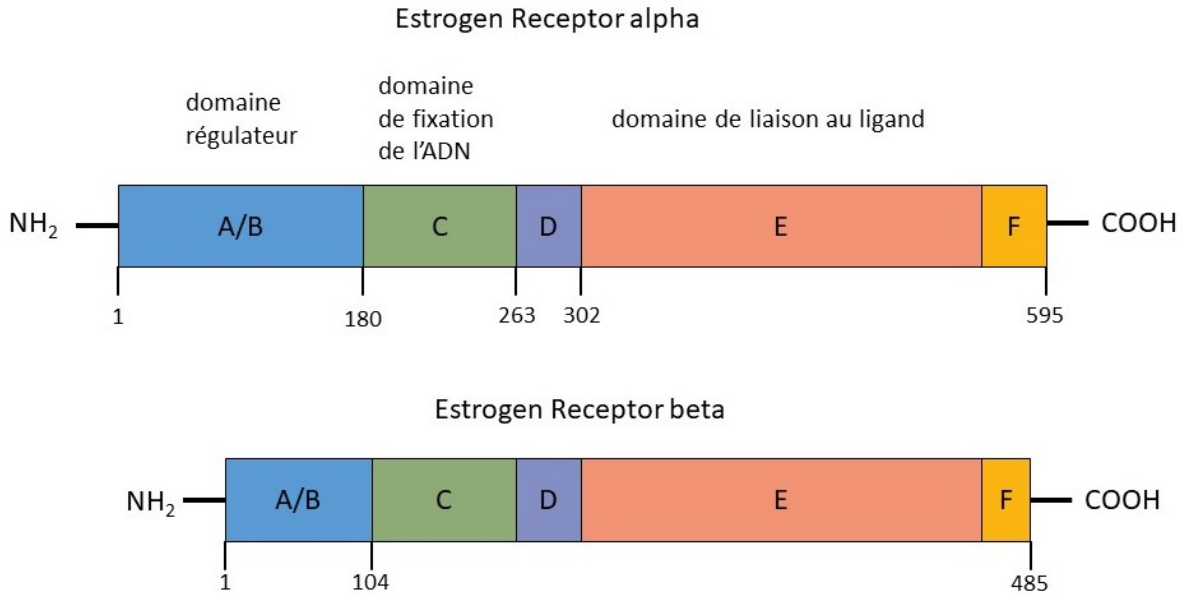


Figure 18: Représentation schématique des domaines constituants les récepteurs aux œstrogènes α et β

On y retrouve les 6 domaines notés de A à F. Le domaine D représente une zone charnière entre les domaines C et E servant à la localisation nucléaire. Le domaine F forme le C-terminal. Entre ERα et ERβ, les domaines D et E possèdent une grande homologie de séquences.

Issu du site https://obgynkey.com, adapté par Rabiant K.

Il existe également un autre type de récepteur aux œstrogènes lié à une protéine G. Ce récepteur GPER1 (aussi appelé GPR30) est codé par le gène GPER et se trouve sur la membrane de la cellule qui le possède. Lorsque l'estradiol se lie à ce récepteur, ce dernier est responsable d'une réponse plus rapide que les ERα et β. En effet, la fixation de l'estradiol à GPER1 va permettre une réponse non génomique résultant en une mobilisation intracellulaire de calcium (Hazell *et al.*, 2009).

2.4 Répartitions et fonctions des récepteurs ERα et ERβ

Les ERs se retrouvent dans de nombreux tissus. Dans certains organes, on retrouve les deux types de récepteurs dans des quantités similaires mais pour d'autres, l'une des deux formes prédomine. Il est possible également de retrouver les 2 types de récepteurs dans un même organe, mais exprimés dans des cellules différentes. Ainsi, ERα est principalement exprimé dans les organes génitaux féminins (utérus, ovaires) et les glandes mamaires, mais également dans les organes génitaux masculins (stroma prostatique, testicules et épididymes). On le retrouve également dans les os, le foie et certaines régions du cerveau. La forme ERβ se retrouve plus particulièrement au niveau du colon, de la prostate, des testicules, des ovaires, de la moelle épinière, des glandes salivaires et dans certaines régions du cerveau (Dahlman-wright *et al.*, 2006). Dans le cerveau, les répartitions sont également inégales. Des régions comme les noyaux de la strie terminale, la partie médiale et corticale de l'amygdale, l'aire préoptique, le noyau parabrachial ou encore le locus cœruleus expriment les 2 formes de récepteurs. L'isoforme ERα se retrouve seule dans le noyau hypothalamique ventromédian et dans l'organe subfornical. Au contraire, les neurones du bulbe olfactif, des noyaux supraoptique, paraventriculaire, suprachiasmatique, ainsi qu'hypothalamique tubéral contiennent exclusivement la forme ERβ, tout comme la *zona incerta*, l'aire tegmentale ventrale, le *cerebellum*, une partie de la moelle épinière et les glandes pinéales. Cependant, même si les deux types de récepteurs sont exprimés dans certains neurones du noyau arqué et de l'hippocampe, on note tout de même une prévalence de ERα dans le noyau arqué, et de ERβ dans l'hippocampe (Shughrue, Komm and Merchenthaler, 1996; Chu and Fuller, 1997; Shughrue *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1998; Hileman, Handa and Jackson, 1999; Österlund *et al.*, 2000; Mitra *et al.*, 2003). Dans l'hippocampe du rat et de la souris, les ERα nucléaires se trouvent uniquement au niveau des interneurones tandis que ERβ n'est pas présent au niveau nucléaire. Cependant, ces deux types de récepteurs se trouvent de manière plus abondante sur des sites extra-nucléaires tels que le cytoplasme, l'endosome des cellules pyramidales et granulaires ou encore les mitochondries. Chez les deux espèces de rongeurs, ERα et ERβ se retrouvent au niveau des axones, de leur terminaison, des dendrites, des épines dendritiques des neurones pyramidaux ainsi qu'au niveau des cellules granulaires et des astrocytes proches des cellules pyramidales (Milner *et al.*, 2001, 2005; Mitra *et al.*, 2003; Mitterling *et al.*, 2010). La présence de ERβ au niveau de la membrane plasmique des neurones semble être

déclenchée par la présence d'estradiol puisque son application dans une culture de cellules d'hippocampe de souris permet d'observer 5min après l'application, une translocation des ERβ mais pas des ERα au niveau de la membrane plasmique (Sheldahl *et al.*, 2008). Ce résultat suggère que l'estradiol déclenche cette translocation des ERβ, et potentiellement, déclenche la signalisation cellulaire. Pris dans leur ensemble, ces résultats semblent indiquer que l'estradiol fixe les récepteurs ERα et ERβ à différents endroits de la cellule. Ainsi, pour les réponses non-génomiques, l'estradiol se fixerait sur les ERα au niveau de la membrane plasmique pour déclencher sa cascade de signalisation, tandis que les ERβ capteraient l'estradiol dans le cytoplasme ou le noyau du neurone, avant de transloquer vers la membrane plasmique sous l'effet de l'estradiol, pour se rapprocher des molécules permettant aux récepteurs de déclencher leur cascade de signalisation. Cette hypothèse est cohérente avec la littérature qui indique une présence plus importante des récepteurs ERα à la surface de la membrane plasmique de cellules placées dans un environnement sans estradiol ainsi qu'une activation plus rapide des voies de signalisation de ces récepteurs comparés aux récepteurs ERβ (Wade *et al.*, 2001).

Concernant GPER1, on le trouve principalement et en grande quantité dans le prosencéphale (le cortex, l'hypothalamus et l'hippocampe) mais également dans des noyaux spécifiques du mésencéphale (les noyaux pontiques et le locus cœruleus) (Hazell *et al.*, 2009). Au sein de l'hippocampe, on le retrouve plus particulièrement au niveau des astrocytes et des neurones pyramidaux où ils sont localisés sur la membrane des axones, les axones terminaux, sur les corps cellulaires, dans les dendrites et les épines dendritiques (Waters *et al.*, 2015).

Des souris *knock-out* aux récepteurs ERα et ERβ ont permis de mettre en évidence certaines fonctions de ces récepteurs. Tout d'abord, l'absence de ERα provoque des anomalies morphologiques chez les souris, avec une immaturité du système génital, un développement incomplet des glandes mammaires et une insensibilité aux œstrogènes. Chez les mâles, on observe une atrophie des testicules et une diminution de la fertilité provoquée par une maturation incomplète des spermatozoïdes. Dans les deux genres, on note également une légère diminution de la densité osseuse et un système cardiovasculaire altéré. Concernant l'absence de ERβ, les femelles présentent une réduction des fonctions ovariennes et les mâles développent une hyperplasie prostatique mais les deux sexes restent fertiles. Les souris

double *knock-out* présentent des symptômes similaires à ceux des souris *knock-out* pour le récepteur ERα avec une stérilité partielle pour les femelles (Couse and Korach, 1999; Pettersson and Gustafsson, 2001; Ascenzi, Bocedi and Marino, 2006). De manière intéressante, des souris *knock-out* pour le récepteur GPER1 présentent une réduction de leur anxiété dans un test de light-dark box (boite présentant une partie exposée à la lumière, anxiogène, et une partie dans l'ombre) et dans un labyrinthe en croix surélevé. Cet effet est plus important chez les mâles que chez les femelles (Kastenberger and Schwarzer, 2014) et suggère l'implication de ce récepteur dans la gestion des émotions et/ou du stress.

Concernant les structures impliquées dans la cognition, comme le cortex, le striatum ou encore l'hippocampe, il a été montré que l'altération des capacités cognitives dépendait de modifications génomiques. Les effets génomiques des œstrogènes nécessitent plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour se manifester et sont liés par des changements dans l'expression des gènes (Phan *et al.*, 2012). On retrouve plusieurs caractéristiques particulières dans ces actions génomiques : une latence prolongée, une durée longue, l'implication d'une transcription génique et d'une synthèse protéique (pour revue voir (Guerriero, 2009)). Comme ses analogues non-nucléaire, les récepteurs aux œstrogènes nucléaires existent sous la forme ERα et ERβ. Au contact de leur ligand, ces récepteurs vont se lier à un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) dans la région promotrice du gène cible et vont exercer une modulation de son expression (Morissette *et al.*, 2008). Par exemple, il a été mis en évidence que le gène HOXC10, impliqué dans le développement de la moelle épinière et la formation des neurones, est l'une des cibles des récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, le promoteur du gène HOXC10 possède plusieurs EREs, particulièrement ERE1 et ERE6, qui sont impliqués dans la surexpression du gène HOXC10 en présence d'œstrogènes (Ansari *et al.*, 2012). Une autre cible des œstrogènes est le récepteur Apo D, codant pour l'apolipoprotéine D, une protéine participant au transport des molécules hydrophobes, comme le cholestérol, vers le foie. On retrouve l'apolipoprotéine D surexprimée dans des pathologies cognitives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et chez des patients atteints de démence ou de schizophrénie (Rassart *et al.*, 2000; Ordoñez *et al.*, 2006). Il a été montré que le gène Apo D possédait 3 EREs dans son promoteur et que les œstrogènes peuvent moduler l'expression de ce gène (Ordóñez *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que, chez des souris ovariectomisées traitées à l'estradiol, on retrouve 88 gènes présentant une altération de leur taux de transcription (Humphreys, Ziegler and Nardulli, 2014). Une autre analyse de gènes a

également montré que les œstrogènes répriment l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la taille du cerveau (Shi, Lin and Su, 2015). De plus, lorsque les EREs sont supprimés des promoteurs de ces gènes, l'effet des œstrogènes est bloqué, ce qui suggèrent l'implication des œstrogènes dans la modulation de la taille du cerveau, ce qui pourrait expliquer la différence de volume observée entre les hommes et les femmes (Shi, Lin and Su, 2015). En plus de ces effets, les œstrogènes peuvent servir de cofacteurs sur des sites non-EREs qui interagissent avec d'autres éléments de liaison de l'ADN, tel que AP-1 et c-Jun possédant des propriétés anti-apoptotiques et qui sont nécessaires dans la progression du cycle cellulaire (Varea *et al.*, 2009).

Concernant une coopération des deux mécanismes, cette dernière est possible. On considère comme classique, la voie d'activation pendant laquelle les œstrogènes vont se lier à leurs récepteurs qui vont, à leur tour, se lier aux EREs et altérer la transcription des gènes (Phan *et al.*, 2012). La voie non classique des récepteurs ERα et ERβ agit soit par liaison sur des éléments de réponse à l'ADN, soit par une cascade de signalisation (Srivastava and Penzes, 2011), permettant d'initier une réponse hormonale rapide (de l'ordre de la seconde à la minute) (Frick, 2012; Giese and Mizuno, 2013). Les récepteurs aux œstrogènes présents en dehors du noyau se trouvent à la surface de la membrane cellulaire des neurones, mais également dans le cytoplasme des épines dendritiques et des éléments présynaptiques dans plusieurs régions cérébrales, incluant l'hippocampe et le cortex préfrontal médian (pour revue (Srivastava, Woolfrey and Penzes, 2013)). Concernant l'interaction entre ces deux voies, 6 à 12 heures après un traitement aux œstrogènes, on observe une accumulation d'ERβ au niveau du noyau qui va augmenter l'expression des ARN messager de la protéine postsynaptique PSD-95, qui a un rôle important dans la synapse notamment en régulant le trafic des récepteurs AMPA, mais également de la synaptophysine. Ce résultat implique donc la voie d'action dite classique des œstrogènes sur la plasticité synaptique. Cependant, le blocage de la protéine PI3K va partiellement réprimer l'expression de ce PSD-95 et de la synaptophysine induite par les œstrogènes, suggérant l'implication de la voie indirecte et donc la coopération de ces deux voies de signalisations des œstrogènes (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010). Un autre exemple concerne le neuropeptide Y (NPY) intervenant dans plusieurs fonctions telles que la prise alimentaire, la gestion du stress, la régulation des fonctions sexuelles, etc… (pour revue voir (Tatemoto, 2004)). Les œstrogènes peuvent réguler l'expression de NPY via son promoteur. Cependant, les actions non génomiques des œstrogènes, par les voies d'activation

PI3K/Akt (Phosphatydilinositol 3-kinases) et ERK/MAPK (Extracellular signal-regulated Kinases), sont très importantes dans cette régulation. En effet, l'inhibition de ces voies de signalisation bloque les effets des œstrogènes sur l'expression de NPY, suggérant que les cascades de signalisation rapide déclenchées par les œstrogènes potentialisent les actions génomiques des hormones sexuelles sur l'expression du gène NPY (Titolo *et al.*, 2008).

3. Œstrogènes, mémoire et apprentissage

Historiquement, les effets de l'estradiol sur le cerveau ont été cantonnés à la régulation du comportement sexuelle et de l'ovulation (Gorski, 1973). Depuis plusieurs années déjà, les rôles des œstrogènes, et des hormones gonadiques en général, sur le cerveau sont reconnus. Concernant les œstrogènes, leur implication dans la régulation des humeurs, dans certains désordres psychiatriques, dans les comportements sociaux ainsi que dans les capacités cognitives a été mise en évidence (Gillies and McArthur, 2010; Watson *et al.*, 2010). Les effets des œstrogènes sur la mémoire proviennent principalement de leurs interactions avec l'hippocampe. Dans une culture cellulaire d'hippocampe de rat, ainsi qu'*in vivo* dans l'hippocame dorsal de la souris ovariectomisées et chez le rat mâle non stérilisé, l'application d'estradiol pendant 5 à 10 minutes active une cascade de signalisation cellulaire incluant les voies de ERK et de la PI3K (Kuroki *et al.*, 2000; Yokomaku *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2008). Parmi les récepteurs extra-nucléaires, le GPER1 a été décrit comme étant impliqué dans des tâches cognitives. Hammond et ses collaborateurs ont montré dans deux publications de 2009 et 2012, que ce récepteur facilitait l'acquisition d'une tâche d'apprentissage spatial dans laquelle les rats sont récompensés lorsqu'ils retournent dans le même bras d'un labyrinthe en T que celui qu'ils ont visité lors du test précédent (DMP : *delayed matching-to-position*). De la même manière, le GPER1 aiderait l'apprentissage spatial dans un labyrinthe en Y (Hawley *et al.*, 2014). De plus, là où des souris ovariectomisées témoins ne présentent pas d'apprentissage, l'administration systémique de 17β-estradiol (E2) avant l'acquisition permet de faciliter la reconnaissance spatiale, la reconnaissance d'objet et l'apprentissage lors d'un test de placement d'objet (Phan *et al.*, 2012). De la même manière, l'administration d'un agoniste des récepteurs ERα (le PPT : Propyl Pyrazole Triol) ou du récepteur GPER1 (le G-1) permet d'observer des résultats similaires sur les performances chez des souris OVX (Gabor *et al.*, 2015). Cependant, l'administration d'un agoniste des récepteurs ERβ (le DPN :

Diarylpropionitrile) ne permet d'améliorer que l'apprentissage lors d'un test de placement d'objets (Phan *et al.*, 2011).

Ainsi ces résultats suggèrent que l'estradiol peut intervenir rapidement sur différents types d'apprentissages par l'intermédiaire de ses trois récepteurs et ce, sans action génomique.

Au niveau cellulaire, il a été montré que l'estradiol permet d'augmenter rapidement la densité des synapses *in vivo* chez la ratte ovariectomisée (MacLusky *et al.*, 2005) mais également *in vitro* (Srivastava, 2012; Sellers *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que la transmission synaptique des neurones traités à l'estradiol peut également être impliquée dans l'amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire observées dans un temps court après le traitement à l'E2 (Packard and Teather, 1997a; Holmes, Wide and Galea, 2002; Luine, Jacome and Maclusky, 2003; Fernandez *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2010; Phan *et al.*, 2012, 2015; Fortress *et al.*, 2013). L'administration d'E2 (de 1,5µg/kg à 3µg/kg) par injection systémique ou intrahippocampique, 15 minutes avant l'acquisition, permet d'améliorer les performances de souris ovariectomisées, 40 minutes plus tard, lors de tests de reconnaissance d'objets (impliquant l'hippocampe), de reconnaissance sociale et de reconnaissance de place (Phan *et al.*, 2011, 2012, 2015). De plus, des études ont mis en évidence que l'administration d'E2 pendant la phase de consolidation peut améliorer les performances dans des tâches de NOR ou de position d'objets 24 à 48h après l'exposition (Fernandez *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2010; Fortress *et al.*, 2013). Cependant la dose d'estradiol circulante présente également des effets différentiels. Ainsi, l'exploration de la mémoire de travail, dépendante de l'hippocampe, à l'aide d'un labyrinthe radial ou en T montre qu'une forte dose d'estradiol (1 et 5µg par rat) diminue l'acquisition au contraire d'une faible dose (0,3µg par rat) (Holmes, Wide and Galea, 2002; Wide *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été trouvés chez l'Homme (Hampson, 1990a) mais également chez différents modèles de rongeurs (Frye and Sturgis, 1995; Warren and Juraska, 1997; Jacome *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent donc un effet dose-dépendant de l'E2 sur les fonctions cognitives et mettent en avant le fonctionnement physiologique des œstrogènes, dont l'activité décrit une courbe en « U » inversée notamment au niveau de l'hippocampe. Ainsi, les doses fortes ou faibles d'E2 se traduisent par une atteinte de la mémoire de reconnaissance chez la jeune femme (Bayer *et al.*, 2018). Ce profil d'activité de l'estradiol n'est pas restreint à l'Homme. Il a été également mis en évidence dans des modèles murins. Chez la ratte ovariectomisée, il a été montré que seule la dose de 200µg/kg (17β-estradiol, i.p.) d'estradiol permettait d'améliorer la rétention des rattes 24h après un test de

MWM, les autres doses (100µg/kg et 400µg/kg) n'ayant pas d'effet (Packard and Teather, 1997b). En utilisant le même protocole et la même dose, des résultats similaires ont été obtenus chez la souris ovariectomisée (Gresack and Frick, 2006). Dans sa revue, Packard souligne l'importance de la dose mais également du temps nécessaire pour observer les effets de l'estradiol sur la rétention de la mémoire à la suite d'un test de mémoire de travail spatiale (Packard, 1998), ajoutant à la courbe en forme de « U » inversé un niveau de complexité supplémentaire puisqu'en fonction du délais, la dose optimale ne serait pas la même. Cette idée de dose optimale différente fut approfondie par Inagaki qui s'intéressa à deux types de mémoire avec des tests de reconnaissance d'objets et de positionnement d'objets. En utilisant différentes doses d'E2 chez des rattes ovariectomisées, son équipe montra une augmentation des performances dans le test de positionnement d'objets à une dose de 20µg/kg (en sous-cutané) mais aucun effet pour les doses inférieures (10µg/kg) et supérieures (40 et 60µg/kg), en accord avec la réponse suivant la forme d'un « U » inversé. Cependant, lorsqu'elle s'intéressa à la reconnaissance d'objet, l'équipe d'Inagaki montra une forme de « U » inversé pour des doses plus faibles d'E2, avec comme dose optimale, l'injection de 5µg/kg (Inagaki, Gautreaux and Luine, 2010). Ces résultats soulignent donc une complexité plus importante dans la réponse de l'estradiol puisqu'il ne s'agirait pas simplement d'une courbe en « U » inversé, mais plutôt d'une courbe non monotonique avec plusieurs doses efficaces en fonction des structures étudiées, mais également des tâches cognitives explorées. Enfin, cette courbe a été retrouvé chez la souris ovariectomisée avec des injections intrahippocampique d'estradiol permettant d'augmenter la génèse d'épines dendritiques au niveau de CA1 des femelles qui ont reçu 50nM d'estradiol, comparativement aux femelles qui ont reçu 25 ou 100nM d'estradiol (Phan *et al.*, 2015). Cette génèse d'épines dendritiques pourrait correspondre à la période pendant laquelle les améliorations cognitives sont observables. Cependant, il est intéressant de noter que cette génèse d'épines dendritiques est associée avec une diminution de l'excitabilité de CA1 induite par une diminution de l'activité des récepteurs AMPA correspondant à leur internalisation (Phan *et al.*, 2015).

Ainsi, l'estradiol n'est pas seulement un modulateur à la hausse de la plasticité et donc ne contribue pas qu'à la seule amélioration des performances dans des tâches d'apprentissage et de mémorisation. Chez des souris ovariectomisées, l'E2 mélangé à l'eau des biberons pendant 5 semaines, permettant d'avoir un dosage physiologique d'estradiol, augmente la performance de reconnaissance d'objets mais altère la mémoire spatiale de référence, c'est-

à-dire, la capacité de stocker l'information sur un sujet précis pendant une longue période (Fernandez and Frick, 2004). De la même manière, chez des rattes ovariectomisées, l'exposition chronique à de fortes doses d'E2 peut diminuer les performances de mémoire de travail spatiale (Holmes, Wide and Galea, 2002) mais également les performances dans un test de préférence de place conditionnée (Galea *et al.*, 2001). On retrouve cette altération lors de l'administration aigüe de fortes doses d'estradiol et de progestérone, avec une diminution des performances de la mémoire de référence dans le MWM (Chesler and Juraska, 2000). Chez l'Homme également, une augmentation de la concentration d'œstrogènes endogènes est associée à des performances plus faibles dans des tâches de mémoire de travail spatiale chez des femmes naturellement cyclées (Hampson, 1990a). Cependant, il a été mis en évidence, chez des femmes ménopausées, qu'un taux trop faible d'œstrogènes endogènes était associé avec des déficits cognitifs évalués via le Montréal Cognitive Assessment Scale (Gholizadeh, Sadatmahalleh and Ziaei, 2018), nécessitant alors un apport exogène en estradiol pour récupérer des fonctions cognitives proches des individus témoins. Ce test évalue la mémoire à court terme, plusieurs fonctions exécutives, l'attention, la concentration, la mémoire de travail, le langage et la fluence verbale ainsi que l'orientation spatiotemporelle.

Dans ce contexte, les œstrogènes apparaissent comme des modulateurs complexes de la mémoire de travail et de référence. Cette hormone permet d'améliorer comme de dégrader les performances cognitives en fonction de différents critères tels que la dose administrée, la voie d'administration, la période de la tâche d'apprentissage pendant laquelle elle est administrée (phase d'acquisition, de consolidation, de test…) et le type de tâche demandé (structure impliquée). Ainsi, il est possible que l'E2 agisse sur l'apprentissage et la mémoire par une modification de la plasticité synaptique mais aussi par une influence sur la plasticité structurelle des synapses en agissant sur les dendrites.

4. Œstrogènes et plasticité fonctionnelle

4.1 La plasticité à 2 étapes ou la théorie du « *two-step wiring plasticity* »

Parmi les possibilités d'actions de l'estradiol, une théorie se base sur l'augmentation de la densité des dendrites et l'amélioration de la mémoire observées dans plusieurs modèles animaux. Cette théorie a été nommée « two-step wiring plasticity » pouvant être traduit par la plasticité de connexion en deux étapes (Srivastava *et al.*, 2008). Selon cette théorie, la présence d'estradiol induirait chez les neurones un état favorisant leur efficacité de réponses aux stimuli. Cet état impliquerait une modulation de la structure et des fonctions des dendrites. Dans la première étape, l'estradiol va augmenter de manière transitoire le nombre d'épines dendritiques et générer des synapses silencieuses en retirant les récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA1 et en ajoutant des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN1 au niveau des synapses naissantes. Ainsi, l'estradiol induit un état de communication favorable en augmentant à la fois le nombre de synapses silencieuses pouvant être recrutées à la prochaine stimulation et la connectivité du système. La seconde phase est fonction de la présence, ou non, d'une stimulation. Dans le cas où la synapse n'est pas stimulée, les épines précédemment générées par la présence d'estradiol seront éliminées et les niveaux des récepteurs contenant GluA1 et GluN1 retrouverons leur état initial. Ce mécanisme permet de retourner à l'état de « repos » des neurones, correspondant à l'état fonctionnel précédant la présence d'estradiol. Dans le cas où le système est soumis à une stimulation, les épines dendritiques induites par l'estradiol vont persister, provoquant une diminution de la présence de la sous-unité GluA1 et une augmentation de celle de la sous-unité GluN1 au niveau des nouvelles dendrites mais également dans celles pré-existantes, conduisant à une augmentation à long terme (24h) de la transmission et de la connectivité de la synapse (Srivastava, 2012). Ainsi il est possible que l'estradiol, en agissant sur les récepteurs aux œstrogènes, stimule la phosphorylation de la sous-unité GluA1 comme décrite dans le chapitre « Hippocampe » (3. Plasticité synaptique, page 74), aboutissant à une internalisation des récepteurs AMPA. De plus, le recrutement de récepteurs NMDA à la surface de la membrane cellulaire va renforcer l'efficacité de la transmission, fonction de leurs compositions en sous-unité GluN2A ou GluN2B. Cette théorie de plasticité de connexion à deux étapes a été testée sur culture cellulaire de neurones corticaux (Srivastava *et al.*, 2008)

et pourrait bien représenter l'un des mécanismes par lequel l'estradiol peut exercer sa modulation sur les capacités d'apprentissage dans d'autres structures (Lymer *et al.*, 2018).

4.2 Œstrogènes et Potentialisation à Long Terme

Concernant la plasticité, il a été mis en évidence que les œstrogènes facilitent l'induction de la PLT chez des rats *in vivo* en phase de prœstrus (correspondant au pic d'estradiol endogène) (Warren *et al.*, 1995; Good, Day and Muir, 1999). Chez des rattes ovariectomisées, l'estradiol améliore l'induction également, sans modification des réponses synaptiques basales des neurones de CA1 (Córdoba Montoya and Carrer, 1997). Cependant, l'inverse a également été mis en évidence puisque des études ont montré que ni l'ovariectomie, ni le traitement à l'estradiol n'a d'incidence sur la PLT *in vivo* (Day and Good, 2005) et *in vitro* (Barraclough, Ingram and Brown, 1999). Ces différences peuvent être le résultat des modèles utilisés. En effet, parmi ces études, les souches de rats, mais également l'âge et les protocoles expérimentaux sont différents (ovariectomie, protocole de stimulation, etc…). L'amélioration de la PLT par l'estradiol impliquerait la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA au niveau de l'hippocampe (Vedder *et al.*, 2013). Ce résultat a été obtenu par l'utilisation d'un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B qui bloque cette augmentation de la PLT (Smith and McMahon, 2006). Une autre étude a également montré ce lien entre estradiol et GluN2B (Smith *et al.*, 2016). Elle met en évidence chez des rattes ovariectomisées le recrutement de récepteurs NMDA exprimant la sous-unité GluN2B pendant la phase d'induction de la PLT. Le blocage de cette sous-unité, ou de la voie de ERK, également mise à contribution, empêche l'induction de la PLT au niveau des synapses entre le cortex entorhinal et les neurones pyramidaux de CA1 chez les rattes ovariectomisées traitées à l'estradiol, mais pas chez les rattes ovariectomisées témoins. Enfin, une autre voie d'activation a été mise en évidence par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs acétylcholinergiques de type muscarinique. Chez des rattes ovariectomisées traitées chroniquement à l'estradiol pendant 5 mois (par le biais d'une capsule sous-cutanée), l'utilisation de la scopolamine (1µM) bloque l'augmentation de la PLT induite par ce traitement à l'estradiol (Stelly *et al.*, 2012) impliquant ces récepteurs dans la modification de la plasticité induite par l'estradiol. Une étude récente a mesuré les performances des rattes ovariectomisées atteintes d'une défaillance rénale chronique dans un test de MWM. L'administration d'estradiol, bien qu'améliorant la plasticité synaptique de

type PLT chez des rattes ovariectomisées sans défaillance rénale, provoque une diminution des performances lors du test sans avoir d'effet sur la PLT chez des rattes ovariectomisées atteintes de défaillances rénales chroniques. Cet effet est associé à une augmentation du stress oxydatif au niveau de l'hippocampe (Sharifi, Reisi and Malek, 2019). Ces résultats ajoutent donc un niveau de complexité à la compréhension du fonctionnement de l'estradiol, en particulier sur les mécanismes d'action par lesquels l'estradiol va avoir des répercussions sur les fonctions cognitives des femmes ménopausées. Enfin, l'estradiol facilite également la PLT dans d'autres structures cérébrales, notamment le cortex préfrontal médian chez des souris ovariectomisées. En effet, l'utilisation d'un agoniste ERβ, mais pas ERα, permet de récupérer une PLT normale chez ces femelles ovariectomisées, suggérant l'implication de ce récepteur dans la PLT (Galvin and Ninan, 2014). Il est également important de noter que les effets de l'estradiol sur la plasticité ne concernent pas uniquement les femelles. Il a en effet été montré à de multiples reprises que l'estradiol a des effets chez les mâles. L'utilisation du letrozole, un antagoniste de l'aromatase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'estradiol depuis la testostérone, diminue l'amplitude de la PLT chez des rats mâles (Grassi *et al.*, 2011; Di Mauro *et al.*, 2015). Ce résultat indique l'importance de la synthèse d'œstrogènes dans l'hippocampe chez les mâles. L'implication des ERs est également présente puisque la PLT induite par l'administration d'estradiol dans le bain des tranches d'hippocampe de rats mâles est bloquée par l'utilisation d'antagonistes des ERs mais également par des antagonistes des kinases (ERK, MAPK, PKA, PKC, PI3K et CaMKII) les impliquant dans le mécanisme d'action de l'estradiol (Hasegawa *et al.*, 2015). En accord avec ces résultats, il a été récemment mis en évidence l'implication des kinases AKT et ERK dans les mécanismes d'action de l'estradiol, au niveau de l'hippocampe. En utilisant des souris mâles et femelles dont le gène codant pour l'aromatase a été invalidé au niveau du cerveau antérieur (appelé FBN-ARO-KO), l'équipe de Lu montre une diminution des densités synaptique et dendritique, ainsi qu'une diminution des performances lors de tests explorant la mémoire de référence spatiale dépendant de l'hippocampe, la mémoire de référence et la mémoire de peur contextuelle tout en conservant des niveaux d'anxiété normaux ainsi qu'une activité locomotrice normale (Lu *et al.*, 2019). De plus, une injection d'estradiol exogène chez les animaux FBN-ARO-KO permettait de récupérer des activités normales dans tous les domaines, soulignant ainsi l'importance de l'estradiol dans ces effets cognitifs. Pour terminer, l'équipe de Lu a également enregistré la plasticité synaptique chez ces animaux FBN-ARO-KO et a mesuré une induction

normale de la PLT mais une amplitude diminuée, récupérée néanmoins par application d'estradiol *in vitro*. L'utilisation d'inhibiteur de la voie MEK/ERK leur a permis de montrer l'implication de cette voie de signalisation puisqu'elle prévient la récupération d'une PLT normale après l'application d'estradiol *in vitro* (Lu *et al.*, 2019). Prise dans son ensemble, cette étude montre l'importance des œstrogènes produites par les neurones dans les fonctions cognitives chez des souris, sans distinction de genre.

Une autre étude récente montre chez les rats mâles, l'importance des ERs, à la fois ERα et ERβ, dans l'induction de la PLT, mais pas de la DLT, puisque l'utilisation d'un antagoniste des ERs va abolir la PLT quand l'utilisation d'un antagoniste spécifique à ERα ou ERβ ne va que partiellement diminuer la DLT (Tozzi *et al.*, 2019). Enfin, le récepteur NMDA est également impliqué. En effet, chez le mâle, l'application d'estradiol dans le bain des tranches d'hippocampe va provoquer une augmentation transitoire du PPSE alors que l'application concomitante de NMDA et d'estradiol va transformer une DLT en une PLT (Shiroma, Yamaguchi and Kometani, 2005). Dans ce dernier cas, il est possible que l'estradiol, en potentialisant les récepteurs NMDA, provoque une entrée plus massive de Ca^{2+} responsable du déclenchement de la PLT à la place de la DLT (voir chapitre « Hippocampe », 3.2 La potentialisation à long terme, page 80).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'estradiol, par le biais de diverses voies de signalisation et par l'activation de plusieurs récepteurs, est capable de réguler et d'altérer la PLT chez les mâles, comme chez les femelles, et que ses effets varient en fonction des protocoles et des modèles utilisés. Mais qu'en est-il de la DLT ?

4.3 Œstrogènes et Dépression à Long Terme

Après les premières découvertes des capacités de régulation de l'estradiol sur la PLT, il ne fallut pas attendre bien longtemps pour que la communauté scientifique s'intéresse à son opposé, la DLT. Good et collaborateurs ont montré en 1999 chez des rattes *in vivo* que la phase de prœstrus est associée à une diminution de l'amplitude de la DLT (Good, Day and Muir, 1999). Cependant, une année plus tard, il a été montré chez des femelles ovariectomisées que 2 injections d'estradiol à 24h d'intervalle permettait d'augmenter la DLT *ex vivo* (Desmond, Zhang and Levy, 2000). Une autre étude met en évidence que l'estradiol diminue simplement

le seuil de déclenchement de la DLT (Reza Zamani, Desmond and Levy, 2000), et que cela nécessite des récepteurs NMDA fonctionnels. Chez la femelle ovariectomisée *in vivo*, il a été observé une plus grande difficulté à induire de la DLT. Cependant, un traitement chronique à l'estradiol permit de récupérer une induction normale (Day and Good, 2005). Ce résultat souligne déjà une différence entre l'effet *ex vivo* et *in vivo* de l'estradiol sur la DLT où il peut agir comme un potentiateur ou un inhibiteur de la plasticité de type DLT. Dans les 3 dernières études, la dose d'estradiol utilisée est la même (10µg) mais les protocoles d'injections sont différents. Pour les études de Desmond et Zamani, la ratte ovariectomisée subie 2 injections d'estradiol espacées de 24h suivies d'un sacrifice 48h après alors que les travaux de Day utilisent un protocole chronique d'une seule injection d'estradiol toutes les 48h pendant 5 semaines.

Concernant les récepteurs impliqués, il semblerait que l'ERα soit le plus impliqué dans le cas de la DLT. En effet, en utilisant des modèles rongeurs mâles, Mukai et collaborateurs ont montré que l'estradiol tout comme la PPT, l'antagoniste spécifique ERα, augmentaient la DLT et la génèse d'épines dendritiques au sein de l'hippocampe tandis que la DPN, l'antagoniste spécifique ERβ, diminuait la DLT sans effet sur la génèse d'épines dendritiques (Mukai *et al.*, 2007). Ces résultats impliquent un rôle moins important de ERβ dans les phénomènes de plasticité chez les mâles. De plus, des résultats similaires ont été observés chez des souris mâles (Murakami *et al.*, 2015). Ces deux étudent montrent une homologie potentielle entre les espèces et l'implication des ERs, principalement ERα, sur la DLT, chez les mâles. L'implication privilégiée des récepteurs ERα a également été mise en avant par l'utilisation de souris ERαKO et ERβKO. Dans cette étude, Murakami et ses collaborateurs ont mesuré une augmentation rapide de la DLT induite par l'estradiol via une activation des récepteurs NMDA chez des souris sauvages mais pas chez les souris ERαKO, soulignant encore une fois, la plus grande implication de ce récepteur dans les phénomènes de plasticité (Murakami *et al.*, 2015). Cependant, ce résultat est également soumis au modèle animal puisque chez des rats mâles, l'utilisation des antagonistes des ERs, ou plus spécifiquement de celui d'ERα et de ERβ, n'a pas permis de mettre évidence une implication des ERs dans la DLT (Tozzi *et al.*, 2019).

Enfin, l'âge est également un facteur à prendre en compte puisqu'il a été montré chez les mâles que l'administration d'estradiol dans le bain des tranches d'hippocampe bloque l'induction de la DLT chez des rats âgés mais ne fait que diminuer légèrement la DLT chez des rats adultes (Vouimba *et al.*, 2000). De plus, la présence concomitante d'estradiol et de DHPG,

Dihydroxyphenylglycine (un agoniste des mGluR 1 et 5), dans le bain permet l'induction d'une DLT chez le rat mâle adulte, soulignant une autre voie d'activation possible de l'estradiol dans la régulation de la plasticité de l'hippocampe (Shiroma, Yamaguchi and Kometani, 2005).

4.4 Œstrogènes, plasticité structurelle et excitabilité synaptique

La modulation de la plasticité synaptique hippocampique par les œstrogènes ne fait aucun doute. Que ce soit par l'activation de ses propres récepteurs ERα et ERβ, ou par l'activation des récepteurs NMDA ionotropiques ou des récepteurs au glutamate métabotropiques via une cascade de signalisation, l'estradiol est capable d'altérer la bidirectionnalité de la plasticité synaptique. Cependant, ses effets sur l'hippocampe ne s'arrêtent pas là. Il a rapidement été mis en évidence que l'ovariectomie diminue le nombre d'épines dendritiques dans l'hippocampe et que l'administration d'estradiol exogène permet de corriger cette atteinte (Gould *et al.*, 1990). Même pendant le cycle de l'œstrus, la densité des épines dendritiques va évoluer au niveau de CA1, avec une augmentation pendant la phase de prœstrus, puis une diminution pendant les autres phases. Chez les rats et les souris ovariectomisées, on retrouve cette densité diminuée (Woolley and McEwen, 1992). De plus, l'estradiol augmente la densité dendritique dans le CA1 de rats mâles (Hasegawa *et al.*, 2015), augmentation que l'on retrouve lors de la phase de metœstrus, amorçant le pic d'estradiol (López Mendoza, Bravo Durán and Silva Gómez, 2018). La phase de prœstrus augmente la prolifération cellulaire contrairement à l'œstrus, marqué par une brusque diminution du taux d'estradiol (Tanapat *et al.*, 1999) suggérant que le pic d'estradiol de la phase de prœstrus induit cette prolifération accrue. Chez la femelle ovariectomisée, l'administration d'estradiol permet de récupérer une neurogénèse normale au sein du gyrus denté (Tanapat *et al.*, 1999). L'estradiol va également permettre de réguler la prolifération cellulaire dans le gyrus denté à la hausse, comme à la baisse, en fonction du délai suivant son administration. À court terme, on mesure une augmentation de la prolifération cellulaire, tandis qu'à long terme, on observe une diminution de cette prolifération, en agissant sur le système adrénergique (Ormerod, Lee and Galea, 2002). De plus, une forte dose d'estradiol permet d'augmenter les taux de NGF (Nerve Growth Factor) et de synaptophysine dans l'hippocampe chez des souris ovariectomisées (Liu, Murray and Jones, 2004) montrant son implication dans les phénomènes de prolifération, de maintenance et de survie des neurones.

Chez ces souris ovariectomisées, l'administration d'estradiol va augmenter les performances de mémoire spatiale lors d'un test de placement d'objet, performances diminuées par l'ovariectomie, mais va également augmenter le nombre d'épines de type « champignons » (Liu, Murray and Jones, 2004). L'utilisation de letrozole, un inhibiteur des aromatases permettant de bloquer la synthèse d'estradiol (pour revue voir (Bhatnagar, 2007)), a permis de mettre en évidence l'implication des œstrogènes dans la maintenance des épines dendritiques à la fois chez les femelles cyclées et celles ovariectomisées (Zhou *et al.*, 2010) mais également dans la consolidation de la mémoire. Ouvrons une rapide parenthèse sur les effets mnésiques du letrozole puisque son administration chez des souris ovariectomisées diminue la consolidation de la mémoire à la suite d'un test de reconnaissance d'objet, mais ne bloque pas la récupération des performances induites par l'administration d'estradiol exogène (Tuscher *et al.*, 2016). De plus, le letrozole induit une atteinte de la mémoire et de l'apprentissage de manière plus importante que l'ovariectomie (Liu *et al.*, 2019). Ces résultats montrent l'importance de la synthèse d'estradiol endogène par les neurones de l'hippocampe, soulignant que la production gonadique n'est pas la seule à affecter les fonctions cognitives (pour revue (Hojo *et al.*, 2008)).

L'estradiol va également augmenter la transmission synaptique excitatrice chez les femelles ovariectomisées, augmenter le relargage de glutamate par l'élément présynaptique (Smejkalova and Woolley, 2010) et augmenter les performances lors d'un test NOR nécessitant la présence de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Vedder *et al.*, 2013). On retrouve l'implication des récepteurs NMDA dans les travaux de l'équipe de Zamani qui montre qu'un prétraitement aux estradiol chez les femelles ovariectomisées permet d'augmenter la réponse tardive des PPSE liés aux récepteurs NMDA dans le champ CA1 (Zamani, Levy and Desmond, 2004). D'autre part, il a été montré que l'application d'estradiol dans le bain des tranches permettait de diminuer l'excitation des neurones de CA1 en diminuant l'activation des récepteurs AMPA par leur internalisation chez des femelles non ovariectomisées (Phan *et al.*, 2015).

Enfin, l'utilisation de rats mâles a permis de montrer que l'application d'estradiol dans le bain des tranches d'hippocampe permettait d'observer une diminution rapide de la densité des épines au niveau de CA3, résultat mimé par l'application de PPT mais pas de DPN, et bloqué par les antagonistes de la voie MAPK (Tsurugizawa *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent

l'implication des ERα dans l'altération de l'intégrité des épines dendritiques au niveau de CA3 chez le mâle, impliquant la voie des MAPK. Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes vont augmenter le nombre ainsi que la densité des épines dendritiques chez le rat mâle (González-Burgos *et al.*, 2012). Également, sur culture cellulaire de neurones corticaux, l'application d'estradiol ou de WAY20020 (un agoniste ERβ) permet d'augmenter la transmission synaptique basale, soulignant l'important des ERβ dans l'excitabilité des neurones (Srivastava *et al.*, 2010). Ces études ont été compilées et synthétisées dans un tableau récapitulatif pour faciliter la lecture transversale des résultats observés en fonction des modèles animaux et des protocoles expérimentaux (Tableau 2).

L'ensemble de ces résultats montrent la pluralité des effets et des fonctions de l'estradiol dans le cerveau et plus particulièrement sur les structures impliquées dans la cognition et la mémoire telle que l'hippocampe. Qu'elle soit gonadique ou cérébrale, la production d'estradiol provoque un grand nombre de modification tant sur la morphologie des synapses que sur leur état d'excitabilité et leur capacité de plasticité. Avec des effets aussi importants chez les mâles que chez les femelles, l'estradiol est un acteur incontournable lorsque l'on s'intéresse à la plasticité synaptique et aux différences de genre. De plus, ses effets varient en fonction des modèles étudiés, des protocoles utilisés, ou des voies d'administration ce qui rend la compréhension de ses mécanismes d'action particulièrement compliquée et cela peut expliquer pourquoi la communauté scientifique s'est restreinte à étudier des mâles pendant tant d'années.

Tableau 2: Liste non exhaustive des études récentes s'intéressant aux effets des E2 sur l'hippocampe.

Abréviations : aug. : augmente ; dim. : diminue ; E.B. : estradiol benzoate ; inj. : injection ; sem. : semaine ; s.c. : sous-cutané ; i.c.v. : intracérébroventriculaire ; i.p. : intrapéritonéal ; antago. : antagoniste ; ago. : agoniste ; hipp. : hippocampe ; CC : corps cellulaire.

Modèle	Molécule(s)	Structure(s)	Tissu	Effets	Auteurs
Rat ♀	Prœstrus	CA1	*In vivo*	Aug. PLT	Warren, 1995
Rat ♀	Prœstrus	CA1	*In vivo*	Aug. PLT Dim. DLT	Good, 1999
Rat ♀ OVX	E.B. 1 inj. (100µg/kg)	CA1	*In vivo*	Basse stimulation, E2 pas d'effet sur excitabilité basale mais aug. PLT.	Cordoba, 1999
Rat ♀ OVX	17β 1inj./48h/5sem.	CA1	*In vivo*	OVX bloque DLT E2 chronique récupère DLT Pas d'effet sur PLT	Day, 2005
Rat ♀ OVX	17β 1inj./24h/13j.	CA1	*Ex vivo*	Pas d'effet sur PLT	Barraclough, 1999
Rat ♀ OVX	17β 2inj. en s.c.	CA3-CA1	*Ex vivo* *In vivo*	E2 aug. PLT, lien GluN2B. E2 aug. performance test NOR	Vedder, 2012
Rat ♀ OVX	17β 1inj./24h/2j.	CA3-CA1	*Ex vivo*	E2 aug. PLT Bloquer par antago. GluN2B	Smith et McMahon, 2005
Rat ♀ OVX	17β 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	E2 recrute NMDAR-GluN2B pendant induction PLT	Smith, 2015
Rat ♀ OVX	17β en capsule 5 mois	Hipp. CA1	*Ex vivo*	E2 aug. PLT Antago. AchRm dim. l'effet E2 chez ♀ OVX	Stelly, 2012
Rat ♀ OVX	17β s.c. 1inj./sem/4sem	CA1	*Ex vivo*	Chez ♀ OVX avec défaillance rénale, E2 dim. performance MWM mais pas d'effet sur PLT	Sharifi, 2019
Souris ♀ OVX	Ago. ERs et 17β 1inj./17h/2j.	CPFm	*Ex vivo*	E2 et ago. ERβ facilite PLT	Galvin et Ninan, 2014
Rat ♂	Letrozole	CA1	*Ex vivo*	Dim. PLT	Grassi, 2011 Di Mauro, 2014
Rat ♂	17β (10nM) dans le bain	Hipp. CA1	*Ex vivo*	Antago. ERs et kinases bloquent PLT induite par E2. E2 aug. densité épine dendritique	Hasegawa, 2015
Rat ♂	Antago. ERs dans le bain	CA1	*Ex vivo*	Activation ERs nécessaire pour déclencher PLT Pas d'effet des antago. sur DLT	Tozzi, 2019

Rat ♂	17β (1nM) dans le bain	CA1	*Ex vivo*	E2 aug. PPSE transitoire E2 + NMDA induit PLT E2 + DHPG induit DLP	Shiroma, 2005
Rat ♀ OVX	17β s.c. (10µg) 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	E2 améliore DLT chez ♀ OVX	Desmond, 2000
Rat ♀ OVX	17β s.c. (10µg) 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	E2 diminue seuil de déclenchement DLT chez ♀ OVX	Zamani, 2000
Rat ♂	17β(0.1–10nM) dans le bain	CA3-CA1 GD	*Ex vivo*	E2 et PPT aug. DLT et génèse d'épines dendritiques	Mukai, 2007
Souris ♂ ERsKO	17β(0.1–10nM) dans le bain	Hipp.	*In vitro*	E2 aug. génèse d'épines dendritiques via ERα E2 aug. DLT via NMDA chez souris WT mais pas ERαKO	Murakami, 2015
Rat ♂	17β (100pM) dans le bain	CA1	*Ex vivo*	E2 bloque DLT chez rats âgés mais pas chez rats adultes	Vouimba, 2000
Rat ♀ OVX	E.B s.c. (10µg/0,1mL) 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	E2 récupère épines dendritiques normales chez ♀OVX	Gould, 1990
Rat ♀	Metœstrus	CA1-CA3	*Ex vivo*	Aug. taille des dendrites	Mendoza, 2018
Rat ♀	Prœstrus	GD	*In vitro*	Aug. prolif. cellulaires vs œstrus E2 récupère une prolifération normale, diminuée par OVX	Tanapat, 1999
Rat ♀ OVX	E.B s.c. (10µg/0,1mL)	GD	*In vitro*	E2 régule prolifération cellulaire dans GD. Effet différentiel en fonction du temps après l'inj. Dim. prolifération à long terme en agissant sur le système adrénergique.	Omerod, 2003
Souris ♀OVX	17β eau buvable, 5sem.	Hipp. néocortex	*In vivo* *In vitro*	Chronique E2 aug. reconnaissance d'objet mais peut dim. mémoire de référence spatiale (dose-dépendant), Haute dose E2 aug. niveau NGF et synaptophysine.	Fernandez, 2004
Souris ♀OVX	17β (1µg) pdt 5j.	Hipp.	*In vivo* *In vitro*	E2 aug. performance mémoire spatiale E2 aug. nbr d'épines type « champignon »	Liu, 2004
Souris ♀OVX	Letrozole i.p.	Hipp.	*In vitro*	Letrozole dim. épines synaptiques chez ♀cyclées et OVX.	Zhou, 2010

Souris ♀OVX	Letrozole i.c.v. E2 i.c.v.	Hipp.	*In vivo*	Letrozole altère consolidation mémoire mais ne bloque pas les effets de E2 exogène.	Tuscher, 2016
Souris ♀OVX Souris ♂	Letrozole i.p.	Hipp	*In vivo* *In vitro*	Letrozole induit une atteinte de la mémoire et de l'apprentissage plus important que l'OVX	Liu, 2019
Rat ♀ OVX	17β 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	E2 aug. transmission synaptique excitatrice E2 aug. relargage glutamate présynaptique	Smejkalova, 2010
Rat ♀ OVX	17β s.c. 1inj./24h/2j.	CA1	*Ex vivo*	Prétraitement E2 aug. la réponse tardive des NMDAR dans CA1	Zamani, 2004
Souris ♀ adulte	17β (25, 50, 100nM)	CA1	*Ex vivo*	E2 dim. excitation en diminuant l'activité des AMPAR (possible internalisation)	Phan, 2015
Rat ♂ adulte	E2 dans le bain (0,1 – 10 nM)	CA3	*In vitro*	E2 dim. densité épines au niveau de CA3 Effet mimer par PPT et bloquer par antago. MAPK	Tsurugizawa, 2005
Rat ♂	Antago. ER (Tam, Ram)	CA1	*In vitro*	Antago. aug. nombre et densité des épines dendritiques	Gonzales-Burgos, 2012
CC de neurones corticaux	17β Ago. ERs	/	*In vitro*	Aug. transmission synaptique basale après infusion de 17β ou de l'ago ERβ mais pas d'effet de l'ago ERα	Srivastava, 2010

5. Différences mâle/femelle

Les effets cognitifs des œstrogènes s'accompagnent de différences liées aux genres. Aussi, et si les effets sur le comportement sexuel sont bien dichotomisés, avec le comportement de monte chez le mâle et de lordose chez la femelle, les effets cognitifs sont moins dimorphiques. On peut toutefois noter que les rongeurs mâles performent mieux que les femelles dans des exercices nécessitant la mémoire spatiale tels que le labyrinthe radial (Williams, Barnett and Meck, 1990; Luine and Rodriguez, 1994), la piscine de Morris ou le test de reconnaissance et de placement d'objet, légèrement différent du test NOR (Beck and Luine, 2002; Bisagno, Ferguson and Luine, 2003). Les mâles présentent également une meilleure rétention dans des tests de peur contextuelle que les femelles (Maren, De Oca and Fanselow, 1994). Cette

différence des sexes est médiée par les œstrogènes puisqu'elle disparait lorsque les femelles sont ovariectomisées, et est retrouvée lors de l'injection d'estradiol exogène chez ces femelles (Gupta *et al.*, 2001).

On retrouve également cette différence chez l'Homme, avec des hommes présentant de meilleurs résultats dans des tests de mémoire spatiale (Hampson, 1990a). Ces différences de genre au niveau de la mémoire spatiale se retrouvent également chez les enfants et deviennent plus importants à l'adolescence (Kerns and Berenbaum, 1991; Voyer, Voyer and Bryden, 1995). Cependant, les femmes présentent de meilleurs résultats dans les capacités verbales, mais également dans des test de perception avec une meilleure vitesse et une plus grande précision (Hampson, 1990b). De plus, les femmes disposent d'une meilleure mémoire à court terme (Duff and Hampson, 2001). Toutefois, les femmes atteintes d'hyperplasie congénitale des glandes surrénales, provoquant chez elles une sécrétion importante de testostérone, semblent développer des réponses cognitives plus proches des hommes, notamment en ce qui concerne la mémoire spatiale (Mueller *et al.*, 2008). Il faut souligner que cette différence liée au genre n'est pas toujours présente. En effet, une étude, utilisant un MWM en 3-D à l'aide d'un environnement virtuel, ne met en évidence une différence liée au genre qu'en cas de tâches spatiales difficiles, indiquant que la différence entre les sexes n'est détectable qu'en cas de tâche ardue (Chamizo *et al.*, 2011). Il a été récemment mis en évidence des différences dans les performances de mémoire épisodique entre des hommes et des femmes âgées de 45-55 ans, mais également entre des femmes en fonction des différents stades de leur ménopause. Ainsi, l'équipe de Rentz montre que les femmes présentent de meilleurs résultats que les hommes dans les tests FNAME (Face-Name Associative Memory Exam ; Test de la mémoire associative visage-nom) et SRT (Selective Reminding Test ; test de rétention sélectif). Cependant, ils ont mis en évidence que les femmes présentant une ménopause déclarée performent moins bien que les femmes en pré- et périménopauses, avec des niveaux de performance qui se rapprochent de ceux des hommes. Enfin, les femmes présentant un taux d'œstrogènes élevé ont de meilleurs résultats sur le test SRT (Rentz *et al.*, 2017) suggérant donc l'importance des œstrogènes dans les capacités cognitives à l'âge adulte.

De plus, les stratégies employées par les mâles ou les femelles sont différentes que ce soit chez l'Homme (Lawton, 1994; Dabbs *et al.*, 1998; Silverman and Choi, 2006) ou chez le rongeur (Korol *et al.*, 2004; Hawley *et al.*, 2012; Grissom *et al.*, 2013) dans le cas d'un apprentissage

d'une tâche de navigation spatiale. La stratégie employant l'hippocampe se base sur le positionnement, tandis que celle utilisant le striatum s'appuie sur des indices, visuels ou proprioceptifs (Maguire *et al.*, 1998; Iaria *et al.*, 2003). En général, dans l'apprentissage d'une carte, les hommes vont privilégier une approche impliquant des indices géométriques (virages, directions, …) quand les femmes utilisent des repères visuels/proprioceptifs (couleurs d'un bâtiment, bruit distinct, …) pour parvenir à s'orienter (Kimura and Galea, 1993; Andersen *et al.*, 2012). Chez les rongeurs, on retrouve cette différence. Les femelles vont privilégier la stratégie stimulus-réponse (plutôt dépendante du striatum) lorsqu'elles sont dans une phase du cycle à faible taux d'œstrogènes, alors que les mâles et les femelles à fort taux d'œstrogènes vont utiliser une stratégie de positionnement (plutôt sous la dépendance de l'hippocampe) pour résoudre le même problème (Williams, Barnett and Meck, 1990; Grissom *et al.*, 2013; Keeley *et al.*, 2013). Des études ont montré qu'une partie de cette stratégie était imputable aux hormones puisque l'orchidectomie de rats diminue l'utilisation de la stratégie de positionnement (Hawley *et al.*, 2012). De la même manière, chez des mâles castrés, une faible dose de testostérone va induire une préférence pour une stratégie de type stimulus-réponse tandis qu'une forte quantité de testostérone va rétablir une stratégie de type positionnement (Spritzer *et al.*, 2013). Ces différences suggèrent qu'en fonction du sexe, ou de la phase du cycle, les individus vont privilégier une stratégie cognitive et donc engager préférentiellement une structure cérébrale pour remplir la même tâche spatiale, ce qui renforce la notion de différence sexuelle dans les approches cognitives (Figure 19).

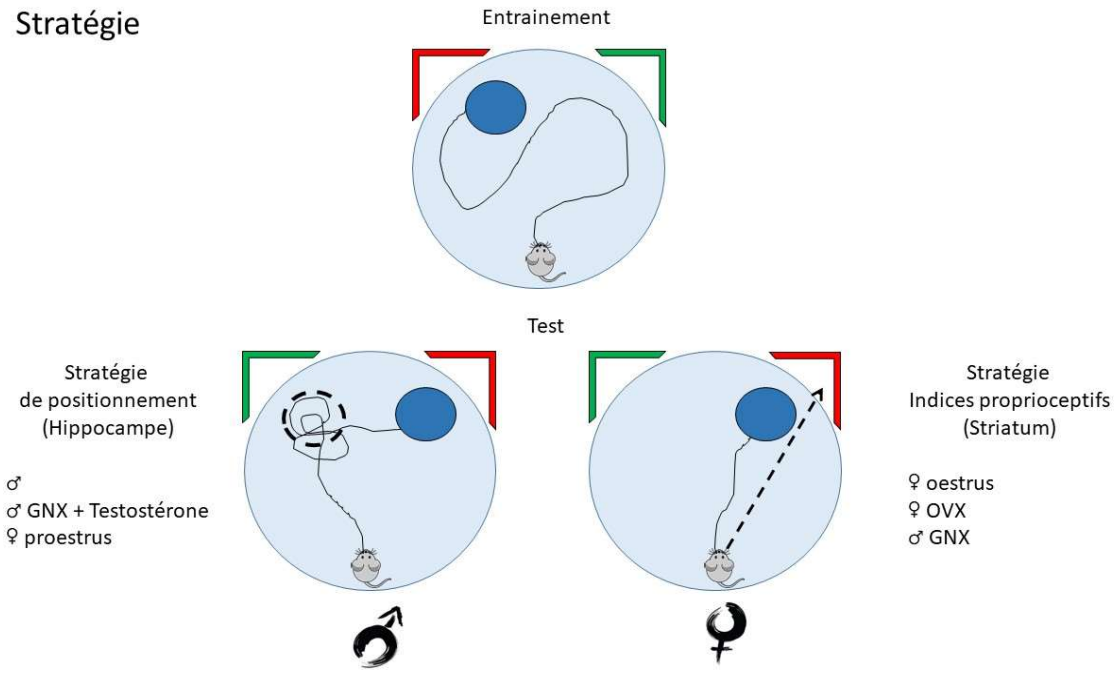


Figure 19: Exemple de stratégie utilisée lors d'un apprentissage spatial en fonction du sexe.

Ici, dans un MWM, les mâles vont privilégier une stratégie de positionnement et vont retourner à l'endroit où se trouvait la plateforme avant de continuer l'exploration. Les femelles vont utiliser une stratégie basée sur les indices proprioceptifs, ici le tableau rouge, vers lequel elles vont se diriger pour retrouver la plateforme.

Rabiant K.

L'utilisation du stress comme stimulus pour mesurer des changements dans les capacités cognitives est souvent retrouvée dans la littérature. Il a d'ailleurs été montré une différence des genres dans les effets que pouvaient avoir le stress chronique sur la mémoire hippocampique. En effet, lorsqu'ils sont exposés à un stress chronique modéré, les mâles montrent une diminution des capacités cognitives tandis que les femelles présentent une amélioration (Bowman, Beck and Luine, 2003). À l'inverse, l'utilisation d'un protocole de contrainte associé à des chocs électriques intermittents au niveau de la queue (stress chronique fort) permet d'obtenir des résultats opposés. Dans ce cas de figure, on observe chez les femelles une diminution du conditionnement « eyeblink » (clignement de l'œil), utilisé pour explorer les structures et mécanismes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire lié à l'hippocampe. Ce test consiste à lier un stimulus visuel ou auditif, avec un stimulus induisant un clignement de paupière (léger souffle sur la rétine par exemple). Ainsi, à la suite d'un stress chronique, les femelles vont présenter une diminution du taux de réponses, abolie par

l'ovariectomie, suggérant l'implication des œstrogènes dans ce phénomène. À l'inverse, les mâles soumis à des conditions similaires vont présenter une augmentation du taux de réponses (Wood and Shors, 1998; Shors, 2001). D'un point de vue neuroanatomique, le stress aigu va inhiber la formation d'épines dendritiques induite par l'estradiol au niveau des neurones de CA1 chez les femelles tandis que ce même stress va augmenter la densité d'épines dendritiques des neurones de CA1 chez les mâles. Cet effet pouvant potentiellement se produire par l'augmentation de la sécrétion de testostérone induisant la formation d'épines chez les mâles (Shors, Chua and Falduto, 2001).

De plus, il a été montré que l'apport d'estradiol augmente la synaptogénèse des femelles mais pas des mâles au niveau de l'aire CA1. Cette augmentation passe par une surrégulation des récepteurs NMDA mais également des ERs non nucléaires. Pour mettre en évidence ceci, l'équipe de Romeo a mesuré l'activité des récepteurs NMDA chez des femelles et des mâles gonadectomisés et ils ont mis en évidence que l'apport exogène d'estradiol permettait d'augmenter l'activation des récepteurs NMDA chez les femelles mais pas chez les mâles. Aussi, les auteurs ont observé une augmentation de l'immunoréactivité des récepteurs ERα chez les femelles en prœstrus comparée à des femelles en œstrus et à des mâles intacts (Romeo *et al.*, 2005). On note également des effets différentiels de l'estradiol sur les courants électrophysiologiques de l'hippocampe. Ainsi, l'estradiol exogène augmente l'amplitude et la fréquence des mini courants postsynaptiques excitateurs, des courants postsynaptique excitateurs spontanés, et des courants calciques transitoires, en agissant à la fois sur l'élément pré- et postsynaptique chez les rats mâles et femelles. Cependant, les effets présynaptiques de l'estradiol sont mimés chez les mâles par un agoniste ERα et par un agoniste ERβ chez les femelles tandis que les effets postsynaptiques de l'estradiol sont, quant à eux, mimés par un agoniste ERβ chez les mâles, et GPER1 chez les femelles (Oberlander and Woolley, 2016). L'apport d'estradiol exogène en quantité physiologique permet d'augmenter la transmission glutamatergique et l'amplitude de la PLT au niveau de l'hippocampe chez les deux sexes (Woolley, 2007; Kramár *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent que des effets similaires chez les deux sexes peuvent se produire par différents mécanismes, complexifiant la compréhension de l'action des œstrogènes. On peut également souligner que l'estradiol supprime les transmissions synaptiques inhibitrices dans le CA1 chez les femelles, mais pas chez les mâles, et ce mécanisme impliquerait les ERα (Huang and Woolley, 2012).

L'application de testostérone, augmentant l'expression de la protéine neuritogénique Neurogenin-3, a permis de mettre en évidence sur des cultures de neurones de l'hippocampe de souris, une diminution de la neuritogénèse, correspondant à la phase précoce de développement des axones et des dendrites, avant leur différenciation, chez les femelles, mais pas chez les mâles (Ruiz-Palmero *et al.*, 2016). La testostérone est convertie en estradiol par les neurones des mâles, débouchant sur une morphologie masculine des neurones tandis qu'en absence de testostérone, les neurones des femelles synthétisent leur estradiol. Ces résultats indiquent que la production d'estradiol indépendante des gonades participe à la différence liée au sexe visible dans le développement des neurones de l'hippocampe.

In vivo, le letrozole va diminuer le nombre de synapses chez les rats femelles mais pas chez les mâles. Cet effet pourrait passer par l'action de la GnRH qui va augmenter la synthèse d'œstrogènes en stimulant l'activité de l'aromatase (Fester *et al.*, 2012), cependant on ne retrouve pas cette différence sur culture cellulaire. Chez la souris, on retrouve des résultats similaires avec une diminution du nombre de synapses au niveau de l'hippocampe aboutissant à une altération de la PLT et à une déstabilisation des épines dendritiques postsynaptiques chez les femelles, altération que l'on ne retrouve pas chez les mâles (Brandt and Rune, 2019). Chez la souris, le letrozole altère la PLT chez les femelles mais pas chez les mâles *in vivo*, et diminue le nombre d'épines de type « champignons » dans les cultures cellulaires issues de femelles (Vierk *et al.*, 2012). Récemment, l'équipe de Jain a montré que, chez des animaux gonadectomisés, la PLT des tranches d'hippocampe est la même entre les sexes en présence d'estradiol. Cependant, ils ont mis en évidence l'implication de la PKA dans l'induction de la PLT chez les femelles, mais pas chez les mâles soulignant une différence dans les mécanismes de potentialisation synaptique (Jain, Huang and Woolley, 2019). On retrouve ces différences dans d'autres structures, notamment dans l'amygdale basolatérale où l'application de letrozole *in vivo*, comme *in vitro*, permet de diminuer la densité des épines synaptiques chez les souris femelles mais pas chez les mâles (Bender *et al.*, 2017). Il est intéressant de noter également que chez des rats prépubères, le letrozole abolit la PLT chez les femelles mais pas chez les mâles (Bender *et al.*, 2017) ce qui, avec les résultats précédents, suggère une réelle différence des genres et pas seulement une différence causée par le décalage dans la maturation des structures. Les différences liées au sexes répertoriés dans cette partie sont regroupées dans un tableau afin de faciliter leur synthèse (Tableau 3).

Tableau 3: Différences liées au genre dans les effets de l'E2.

Abréviations : aug. : augmente ; dim. : diminue ; E.B. : estradiol benzoate ; s.c. : sous-cutané ; ago. : agoniste ; hipp. : hippocampe ; OVX : ovariectomie ; GNX : gonadectomie ; n.o. : non opérés ; syn. : synapses/synaptiques ; inh. : inhibition ; supp. : supprime

Modèle	Traitement	Structure	Tissu	Effets	Auteurs
Rat n.o. / OVX	Stress modéré	/	In vivo	♀ aug. réponse cognitive ♂ dim. réponse cognitive	Bowman, 2003
Rat n.o. / OVX	Stress fort	/	In vivo	♀ dim. réponse cognitive ♂ aug. réponse cognitive	Wood, 1998
Rat	Stress aigu	Hipp.	In vivo	♂ aug. densité épines dendritiques ♀ inh. formation épine dendritiques	Shors, 2001
Rat n.o. / GNX	E.B. 10µg	Hipp.	Ex vivo	E2 aug. synaptogénèse chez ♀ dans CA1 E2 aug. activité RNMDA chez ♀ Aug. immunoreactivité ERα chez ♀ prœstrus	Romeo, 2005
Rat GNX	E2 100nM (bain) Agonistes ERs	Hipp.	Ex vivo	Effet E2 mimé : présyn. : ago. ERα chez ♂ et ago. ERβ chez ♀ postsynp. : ago. ERβ chez ♂ et ago. GPER1 chez ♀	Oberlander et Woolley, 2016
Rat n.o / OVX	E2 (10µg, s.c.) Ago. ERs	Hipp.	Ex vivo	E2 et ago. ERβ aug. transmission glutamatergique et amplitude PLT chez 2 sexes via des changes du cytosquelette	Kramar, 2009
Rat GNX	E2 (1, 10, 100 nM) bain	Hipp.	Ex vivo	E2 supp. Transmission syn. Inhibitrice CA1 chez ♀ mais pas les ♂ via ERα	Huang et Wooley, 2012
Rat n.o.	Letrozole	Hipp.	In vivo	Dim. nbr syn. ♀ mais pas les ♂	Fester, 2012
Souris n.o.	Letrozole	Hipp.	In vivo	Dim. nbr syn. et altération PLT + déstabilisation épines dendritiques postsyn. chez ♀ mais pas chez les ♂	Brandt et Rune, 2019
Souris n.o. / OVX	Letrozole	Hipp.	Ex vivo	Altère PLT chez ♀ mais pas les ♂ Dim. nbr épines champignons chez ♀	Vierk, 2012
Rat GNX	E2 (100nM) bain	Hipp.	Ex vivo	PLT de même amplitude mais dépend de PKA chez ♀ mais pas chez ♂	Jain, 2018
Souris et rats	Letrozole	Amyg.	In vivo Ex vivo	Souris :Dim. densité épines syn. chez ♀ mais pas ♂ Rats prépubères : abolit PLT chez ♀ mais pas ♂	Bender, 2017

Qu'elles soient comportementales, morphologiques, fonctionnelles ou cognitives, les différences entre les sexes semblent majoritairement impliquer le rôle des œstrogènes. Ces derniers agissent sur plusieurs acteurs cellulaires de la mémoire et de la plasticité, que, de manière intéressante, nous retrouvons ciblés également par l'éthanol. Il est donc intéressant de présenter ce que pourraient donner une interaction entre les effets de l'estradiol d'un côté, et de l'éthanol de l'autre, notamment dans un contexte d'apprentissage et de mémorisation.

6. Interactions œstrogènes et éthanol

Nous avons abordé dans un chapitre précédent les différences d'effets de l'éthanol observées chez l'Homme en fonction du genre : altérations des volumes cérébraux, des capacités fonctionnelles de nombreuses structures et des capacités cognitives, sont autant d'exemples de différences mesurées entre les hommes et les femmes vis-à-vis de l'éthanol. Il est donc légitime de se demander si les œstrogènes n'auraient pas un rôle à jouer dans ces différences chez l'Homme, comme dans les différents modèles animaux.

Dès le début des années 1980 une corrélation a été faite entre hormones sexuelles et consommation d'alcool. En effet, il a été mis en évidence que les consommations d'alcool pendant les menstruations des femmes dites « buveuses sociales » augmentaient ; ce n'est toutefois pas le cas des femmes sous contraception (Sutker *et al.*, 1983). Cependant, cette association entre taux d'œstrogènes circulant et consommation d'alcool n'a pas été retrouvée chez les adolescentes en début de puberté (Costello *et al.*, 2007). Il a été montré en 1989 que les femmes alcoolisées (dès 1mL/kg) présentaient un plus grand déficit cognitif que les hommes à dose égale (Haut *et al.*, 1989). Cette différence est retrouvée chez les adolescentes qui semblent donc plus vulnérables que leurs homologues masculins vis-à-vis des troubles cognitifs liés à l'alcool (Caldwell *et al.*, 2005). De plus, il a été montré qu'être une femme est un facteur prédictif dans l'expérience d'épisodes de *black-out*. Dans cette étude, les pertes de mémoires transitoires ont été catégorisées en fonction de leur prévalence pendant l'adolescence. Ainsi, Schuckit et ses collaborateurs montrent dans cette étude, regroupant 1402 adolescents âgés de 15 à 19 ans, des clusters de buveurs en fonction de leurs expériences de *black-out*. L'analyse de la croissance des classes latentes est un type d'analyse qui permet

la construction de classes latentes formées de sous-groupes non-observés (latents) de cas observés. Ces classes sont construites en se basant sur les réponses mesurées des cas d'un ensemble de variable indicatrices. Ainsi les réponses similaires se retrouvent dans une même classe latente. Cette méthode permet donc la création de groupes par une classification probabiliste permettant d'extrapoler, dans notre cas, le comportement des individus. En utilisant cette technique, les auteurs distinguent 4 groupes en fonction de 15 critères de sélection. La classe I regroupe les individus n'ayant jamais expérimenté un *black-out*, la classe II regroupe les individus susceptibles d'avoir une brusque augmentation du nombre de *black-out*, tandis que les classes III et IV regroupe respectivement les individus à risque plus faible et ceux expérimentant un *black-out* à chaque alcoolisation (Figure 20).

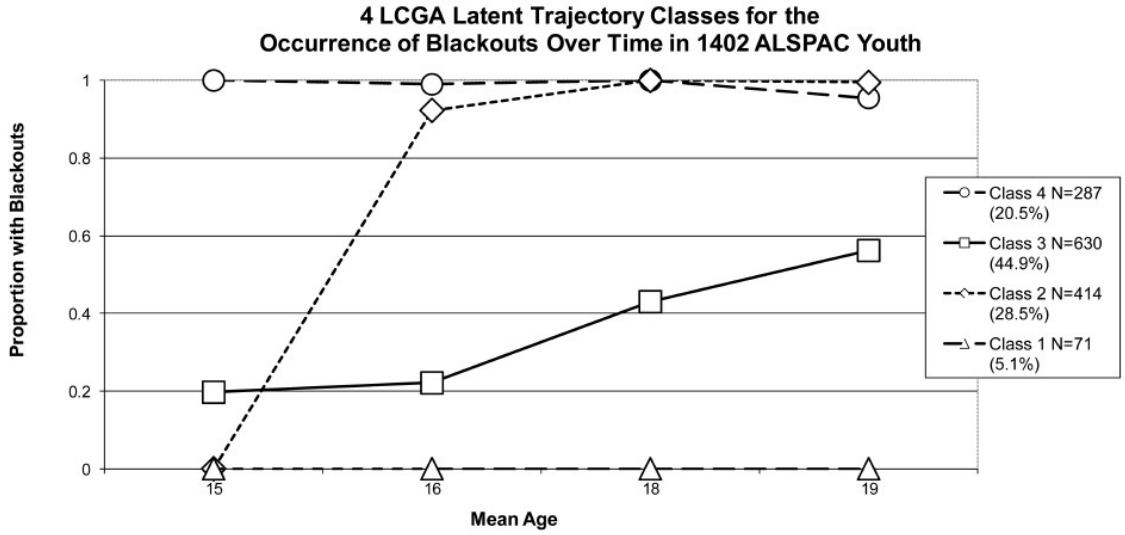


Figure 20: Résultat de l'analyse de la croissance des classes latentes basées sur 15 critères montrant la proportion de black-out en fonction de l'âge.

La classe II regroupe, parmi ses facteurs de risque, le fait d'être une femme

(Schuckit *et al.*, 2015).

L'étude révèle également que l'expérimentation du *black-out* augmente avec l'âge (30% des adolescents de 15 ans ont expérimenté un *black-out* et 74% des adolescents de 19 ans). Enfin, les buveurs appartenant à la classe II, ceux les plus à risque de développer un type de consommation aboutissant à des *black-out* répétés, regroupent différents facteurs de prédiction dont le fait d'être une femme (Schuckit *et al.*, 2015). De plus, on peut également

noter que le fait d'être une femme augmente les risques de tolérance, de comas éthyliques et de blessures liés à l'alcool (Sugarman, Demartini and Carey, 2009).

À l'échelle du modèle animal, les résultats sont plus mitigés que ceux obtenus dans les études cliniques décrites précédemment, même si une majorité des études semble indiquer une association positive entre le taux d'œstrogènes et la consommation d'alcool (Forger and Morin, 1982; Sandberg and Stewart, 1982; Ford, Eldridge and Samson, 2002; Reid *et al.*, 2002; Quirarte *et al.*, 2007; Vetter-O'Hagen and Spear, 2011; Torres *et al.*, 2014) . Ainsi l'estradiol jouerait un rôle sur les consommations d'alcool puisque chez des rats Long-Evans, l'ovariectomie va diminuer la consommation volontaire d'alcool jusqu'à 3 mois après la chirurgie. De plus, l'injection d'estradiol exogène permet de récupérer une consommation d'alcool se rapprochant des individus témoins (Ford, Eldridge and Samson, 2002). Il est intéressant de noter que l'injection d'estradiol chez des femelles témoins permet d'augmenter leur consommation d'éthanol également. On retrouve cette augmentation de consommation chez la souris avec un test de *« Drink in the Dark* » (DID – « boire dans le noir ») qui permet de modéliser une prise d'alcool volontaire pouvant atteindre des taux d'éthanolémie proche d'une alcoolisation ponctuelle importante. Dans ce paradigme, 3 heures après le début de la phase active des animaux, les biberons d'eau sont remplacés par de l'éthanol à 20% pendant 2 heures, les 3 premiers jours. Pour le quatrième jour, les animaux sont exposés 4 heures à l'alcool. À l'aide de ce paradigme, l'équipe de Satta a mis en évidence que les femelles témoins consomment plus d'éthanol que les mâles ou que les femelles ovariectomisées. Cependant, l'injection d'estradiol permet aux femelles ovariectomisées de récupérer une consommation équivalente aux femelles témoins. Néanmoins, dans ce modèle, le cycle ovarien n'a pas d'effet sur la consommation d'alcool (Satta, Hilderbrand and Lasek, 2018).

Enfin, concernant l'apprentissage, il a récemment été étudié l'importance de l'estradiol dans les effets d'une dose aigüe d'EtOH chez les rats mâles et femelles dans une tâche de peur contextuelle conditionnée, associée à l'hippocampe. Dans cette étude, Sircar mesure l'impact d'une injection i.p. d'EtOH (2g/kg) sur la réponse de peur contextuelle conditionnée chez des femelles intactes, ovariectomisées, et chez des mâles intacts. Trente minutes après l'injection d'éthanol, les rats passent une session d'entrainement pendant laquelle une lumière vive (stimulus conditionnel) va être associée à un choc électrique (stimulus inconditionnel) au niveau du sol. Ensuite, 24 heures après l'entrainement, les animaux sont testés. Sircar met

ainsi en évidence qu'à la suite d'une injection aigue d'éthanol, les femelles intactes présentent une altération de leur réponse de conditionnement de peur contextuelle tandis que les mâles ne montrent pas d'altération de cette réponse. En fonction de la phase du cycle, il montre que l'éthanol va altérer la formation de la mémoire sauf pendant l'œstrus, correspondant à la phase où le taux d'estradiol endogène est le plus faible. Ensuite, chez les femelles ovariectomisées, Sircar ne mesure pas d'altération du conditionnement à la suite d'une injection d'éthanol, cependant les atteintes sont récupérées à la suite d'un traitement d'estradiol exogène (E.B 2µg). Enfin, l'injection d'estradiol exogène chez les mâles permet d'induire un comportement proche de celui des femelles avec une altération du conditionnement. En résumé, Sircar montre que l'estradiol peut avoir un effet de modulation important sur la mémoire et le comportement cognitif des rats, et ce, indépendamment du sexe. Dans son étude, l'interaction entre un fort taux d'estradiol, qu'il soit endogène pendant les phases du cycle concernées ou exogène à la suite d'une injection, et une intoxication aigue d'éthanol contribue à expliquer les différences observées entre les mâles et les femelles dans des conditions physiologiques (Sircar, 2019). Toutefois, cette étude récente n'inclue aucune mesure électrophysiologique des mécanismes de plasticité de l'hippocampe par exemple, permettant de lier le comportement à un changement des propriétés des réseaux de neurones et ne présente pas d'investigations des mécanismes cellulaires potentiellement impliqués.

Questions Scientifiques

Après l'exposition du contexte scientifique de mon travail de thèse, il apparait que la différence de sensibilité à l'éthanol observée en clinique, ainsi que les effets cognitifs des œstrogènes dans différentes tâches mnésiques et à différents âges suggèrent qu'une interaction entre les deux molécules est possible. Il nous est donc apparu nécessaire et important de connaître et de comprendre les effets sur l'hippocampe d'une alcoolisation ponctuelle importante chez des rattes adolescentes et jeunes adultes.

Le but de cette thèse a donc été de mettre en évidence s'il existait une différence liée au sexe dans les effets d'un faible nombre d'alcoolisation ponctuelle importante sur la plasticité de l'hippocampe de rats adolescents en s'intéressant à 3 axes d'études: 1.) Existe-t-il une différence liée au genre dans les effets du binge drinking sur la plasticité de l'hippocampe ? 2.) L'estradiol est-il impliqué dans cette différence ? 3.) Quels sont les mécanismes sous-jacents ?

Tout d'abord, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence de cette différence en étudiant la plasticité de l'hippocampe de rattes adolescentes en fonction de leur phase du cycle œstral. Dans la littérature, il a été montré l'impact que pouvait avoir le cycle sur les capacités cognitives ainsi que sur la plasticité synaptique chez la femelle adulte mais peu d'études se sont intéressées à ce facteur pendant l'adolescence et notamment en ce qui concerne la DLT. Nous avons donc enregistré la DLT chez des rattes adolescentes naturellement cyclées afin de les comparer avec les mâles issus de notre précédente étude (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016).

Ensuite, nous avons voulu vérifier l'implication des œstrogènes dans cette différence. L'estradiol étant une substance neuropotente ayant un rôle dans la maturation du cerveau mais également dans le fonctionnement de différentes structures cérébrales, nous avons cherché à mettre en évidence son implication dans la plasticité synaptique chez les rats, mâles comme femelles.

Enfin, nous avons étudié les mécanismes d'action impliqués dans cette différence en étudiant, d'une part, l'implication des ERs qui, selon la littérature, ont un rôle à jouer dans la plasticité de l'hippocampe. D'autre part, nous avons étudié l'implication de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA que nous avons déjà mis en évidence chez les rats mâles afin pouvoir mettre en avant un éventuel mécanisme commun entre les sexes.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Animaux

Les animaux utilisés proviennent de l'élevage Charles River (France). Les rats sont issus de la souche Sprague-Dawley. Les femelles ont été étudiées à 3 stades de leur maturation : le stade pré-pubère (21-25 jours), le stade fin de puberté/début de l'âge adulte (35-45 jours) et le stade adulte (200-250 jours). Les mâles utilisés dans l'étude étaient âgés de 35 à 45 jours ce qui correspond au milieu de leur puberté en accord avec les travaux de Schneider (Schneider et al., 2013). Tous nos animaux ont été hébergés dans une animalerie climatisée avec un cycle jour/nuit artificiel de 12h par période. Les animaux avaient un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau de boisson avec la présence d'enrichissement dans les cages. À leur arrivée dans l'animalerie, les animaux sont pesés, inspectés afin de déceler une éventuelle anomalie morphologique, avant d'être répartis dans des cages à raison de 3 à 5 individus en fonction de leur poids, puis sont laissés au repos pendant 1 semaine. Passer la phase d'acclimatation, les animaux sont marqués à la queue pour débuter les protocoles de détermination du cycle ovarien (pour les femelles) désignant l'entrée dans le protocole expérimental.

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les principes d'utilisation et de soin des animaux de laboratoire de la Communauté Européenne (2010/63/UE, CE Off. J. 20 Octobre 2010) ainsi qu'avec le décret français n°2013-118 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les procédures expérimentales ont été autorisées par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Picardie (CREMEAP) sous le numéro de projet 3829 et sous la responsabilité du Pr Pierrefiche.

2. Agents Pharmacologiques

Une solution d'éthanol 20% (vol/vol) injectable a été préparée à partir d'éthanol 96% (VWR chemicals, Pessac, France) dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9% - Laboratoire Aguettant, Lyon, France). La solution d'œstrogène (20µg/mL) a été préparée à partir de 17β-œstradiol (Sigma-Aldrith, Suède AB, CAS No. [50-28-2]) dissout dans de l'huile de sésame (Sigma-Aldrith, Suède AB, CAS No. [8008-74-0]) et chauffé à 50°C et mélangé pendant une nuit.

3. Détermination du cycle ovarien

La détermination des phases du cycle ovarien a été effectuée par le biais d'un frottis vaginal en état frais suivi d'un comptage cellulaire. Pour préparer les femelles à la procédure, les animaux sont habitués à être manipulés une semaine avant le début des frottis afin de réduire le stress de manutention. Les frottis sont possibles dès l'ouverture naturelle du vagin qui a lieu entre 31 et 35 jours (Rivest, 1991) marquant la maturité sexuelle de l'animal. Une fois l'ouverture constatée, les femelles sont placées sous l'aisselle de l'expérimentateur afin de laisser le bassin de l'animal exposé tout en gardant la tête dans l'obscurité permettant de calmer l'animal. La queue est ensuite saisie et tirée vers le haut afin de rendre accessible l'entrée du vagin dans lequel l'expérimentateur vient insérer la pointe d'une pipette stérile contenant 200µL de sérum physiologique. La pipette est « *flushée* » 2 à 3 fois jusqu'à récupérer un liquide trouble que l'on collecte dans un tube Eppendorf de 0,5 mL. Pour l'analyse cytologique, le prélèvement vaginal est placé sur une lame de Malassez permettant un comptage cellulaire sans coloration. Les cellules sont comptées par le même expérimentateur, pour éviter les biais, sous un microscope optique (Nikon Optiphot, Japon). La détermination des phases du cycle est basée sur le comptage et la description des différents types cellulaires caractérisant les phases du cycle (Hubscher, Brooks and Johnson, 2005; Yener *et al.*, 2007; Paccola *et al.*, 2013). Ainsi, la phase de prœstrus est identifiée par la présence majoritaire de cellules épithéliales (rondes et nucléées), la phase d'œstrus est déterminée par la présence majoritaire de cellules cornées (angulaires, anucléées et arrangées en couche). La phase de metœstrus est confirmée par la présence des 3 types cellulaires en proportion similaire alors que la phase de diœstrus est identifiée par la présence majoritaire de cellules leucocytaires (Figure 21).

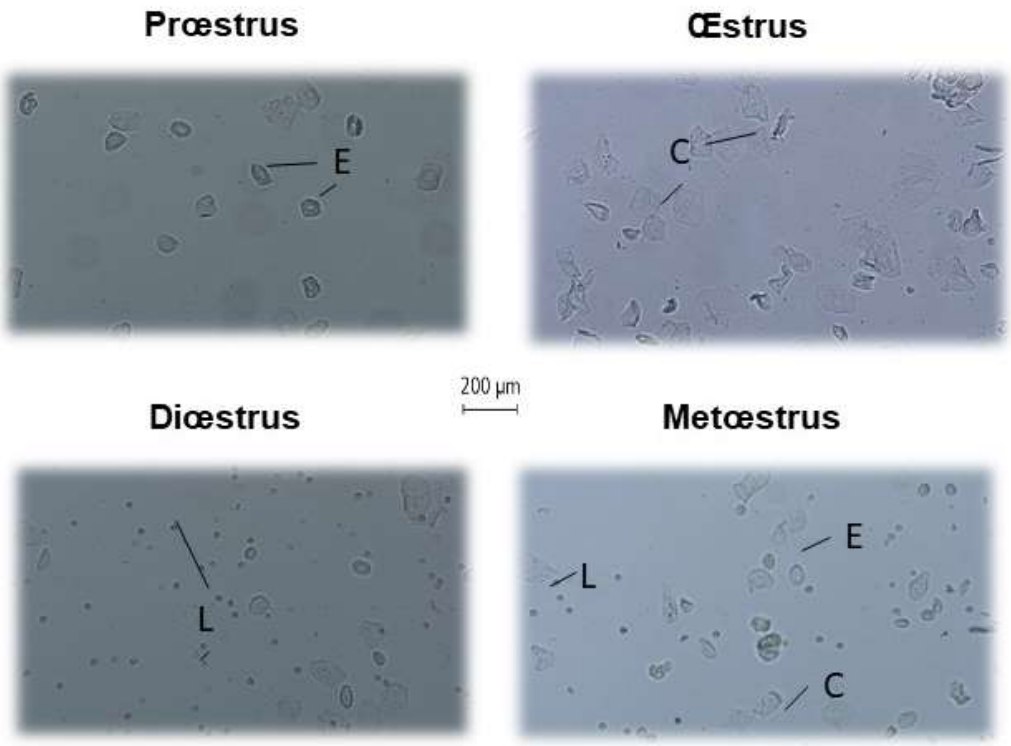


Figure 21: Photographie présentant les différentes phases du cycle œstral avec la différenciation cellulaire.

E : cellule épithéliale, C : cellule cornée, L : leucocyte.

Photographies réalisées par Rabiant K.

4. Alcoolisation de type « *Binge-Drinking* »

Pour étudier les effets du *Binge-Drinking* sur les femelles nous avons utilisé le mode d'exposition à l'éthanol que nous avions précédemment mis en place au laboratoire (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). Cependant, la puberté chez les rats est différente en fonction du sexe puisque les femelles présentent une puberté plus précoce (Schneider, 2013). À 45 jours, âge d'étude choisi pour les mâles, les femelles ont terminé leur puberté et donc, la mise en place de leur cycle ovarien. Or, dans la littérature il est mis en évidence l'implication des hormones sexuelles, et notamment des œstrogènes, dans divers processus cérébraux, y compris la mémoire.

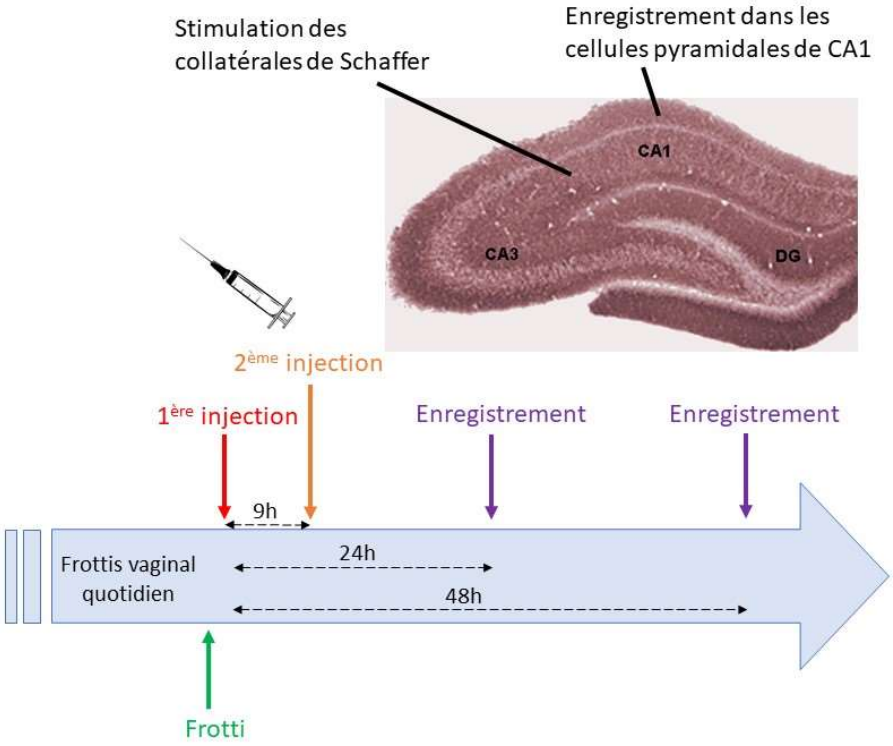
Nous avons choisi de tenir compte des différentes phases du cycle ovarien dans l'étude des effets de l'éthanol et donc de séparer les femelles en fonction de ces différentes phases.

Cette classification arbitraire a été basée sur la concentration en œstrogènes endogènes des différentes phases du cycle ovarien. Le premier groupe correspond à une forte concentration en œstrogènes endogènes, il s'agit de la phase du prœstrus, et le second groupe correspond à une faible concentration en œstrogènes endogènes regroupant ainsi les phases d'œstrus, de metœstrus et de diœstrus. Pour l'étude des effets de l'éthanol, les femelles ont reçu deux injections d'éthanol 20% (v/v) par voie intrapéritonéale à la dose de 3g/kg espacées de 9 heures (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). Les groupes témoins pour les fortes et faibles concentrations endogènes en estradiol ont reçu deux injections de solution saline à volume équivalent. De l'estradiol exogène (180µg/kg) a aussi été utilisé en respectant la même procédure que présentée précédemment. Ainsi, l'estradiol fut injecté uniquement le matin (entre 8h et 9h) et la seconde injection 9 heures après contenait du sérum physiologique. Les groupes témoins pour cette expérience ont reçu une injection d'huile de sésame pour s'assurer de l'innocuité du solvant. La double injection d'éthanol et d'estradiol a été réalisée par deux injections successives de l'éthanol et d'estradiol, suivie d'une seconde double injection d'éthanol et de saline 9 heures après la première. Chez les femelles adultes, l'éthanol a été injecté lors du pic endogène d'œstrogènes (en phase de prœstrus) ou lors d'une des phases présentant un faible taux d'œstrogènes endogènes. Les femelles prépubères ont expérimenté des injections d'éthanol, d'estradiol exogène, ainsi qu'une injection double de la même manière que les femelles pubères.

Pour le tamoxifène (Tam), un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes (ERα et ERβ), il a été préparé à une concentration de 50mM (Hellobio, HB0601) dans du DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma-Aldritch, [D4540]). En fonction des groupes expérimentaux, le Tam a été injecté à 10mg/kg à la suite des premières injections (éthanol, estradiol, NaCl ou éthanol et estradiol) toujours par voie intrapéritonéale. Nous avons choisi cette dose pour son inefficacité à produire des effets sur les fonctions cognitives tout en assurant un blocage des récepteurs aux œstrogènes (Lichtenfels *et al.*, 2017). Le tamoxifène est une molécule cancérigène 1B, H350 et des précautions sont nécessaires à sa manipulation. En plus des dispositions particulières lors de la préparation de l'injection, il est nécessaire de prendre en compte la demi-vie de 7 jours de la molécule et sa métabolisation. Pour cela, à la suite des injections, les animaux ont été séparés dans des cages isolées ou ne contenant que des animaux injectés au Tam afin d'éviter la contamination par les excréments. Après le sacrifice de l'animal, la cage utilisée est isolée, lavée à l'eau de Javel, et la sciure est recueillie et isolée dans des sacs spécialisés. Ces

précautions ont été faites afin d'éviter toute contamination du personnel à la suite de l'utilisation du tamoxifène.

Concernant les mâles, une dose d'éthanol plus importante a été injectée (3,75g/kg (v/v) d'éthanol à 20%) en suivant la même procédure d'injection que les femelles pubères à savoir, 2 injections espacées de 9 heures. De la même manière, les injections d'éthanol seul, d'estradiol seul, ou la double injection suivent les mêmes procédures que celle présentées ci-dessus pour les femelles pubères. Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés 24 ou 48h après le traitement en fonction des protocoles expérimentaux.



Groupe	1ère injection	2ème injection
A	EtOH 3g/kg	EtOH 3g/kg
B	NaCl iso.	NaCl iso.
C	EtOH 3g/kg NaCl iso.	EtOH 3g/kg NaCl iso.
D	E2 180µg/kg NaCl iso.	2x NaCl iso.
E	EtOH 3g/kg E2 180µg/kg	EtOH 3g/kg NaCl iso.
F	2x NaCl iso.	2x NaCl iso.
G	EtOH 3,75g/kg	EtOH 3,75g/kg
H	Tam 10mg/kg NaCl iso.	2x NaCl iso.
I	E2 180µg/kg Tam 10mg/kg	2x NaCl iso.
J	EtOH 3g/kg E2 180µg/kg Tam 10mg/kg	EtOH 3g/kg 2x NaCl iso.

.

Figure 22: Représentation schématique du déroulement des protocoles expérimentaux.

À gauche, la timeline des injections et des enregistrements, et à droite le tableau récapitulant les molécules et les doses administrées lors de la première et de la seconde injection. Les femelles pubères ont subi les injections des groupes A ; B ; C ; D ; E ; F ; H ; I et J. Les femelles prépubères ont subi les injections des groupes C ; D ; E et F. Les mâles pubères ont subi les injections des groupes B ; C ; D ; E ; F et G. Les femelles adultes ont subi les injections des groupes A et B. NB : seules les femelles pubères et adultes ont reçu un frottis vaginal quotidien la semaine précédant leur entrée dans le protocole.

Réalisé par Rabiant K.

5. Électrophysiologie

5.1 Préparation des tranches d'hippocampe

Les animaux sont manipulés jusqu'à ce que passe l'agitation du transport avant d'être rapidement décapités. Le cerveau est extrait et récupéré dans une solution de coupe oxygénée à l'aide de gaz carbogène (95% O_2, 5% CO_2, pH 7,4) et maintenue à une température de 4°C. La solution de coupe est une solution non physiologique comportant une grande quantité de sucrose et de magnésium, ainsi qu'une faible concentration de calcium, aidant la survie du tissu en réduisant l'excitabilité des neurones pendant la dissection. (Tableau 4). Le cervelet et la partie préfrontale du cerveau sont ensuite coupés à l'aide d'une lame de scalpel. Le cerveau est ensuite collé sur sa face antérieure sur la platine d'un vibratome (Leica VT 1200S) avec une colle cyanoacrylate. Le cerveau est alors coupé en tranches coronales de 400µm d'épaisseur. Les tranches sont récupérées et placées dans un collecteur contenant la même solution de coupe et les hippocampes sont extraits des tranches pour travailler sur structure isolée. Pour finir, les hippocampes isolés sont placés dans un bécher contenant du Liquide Cérébro-Spinal artificiel (LCSa) oxygéné à l'aide de gaz carbogène et possédant une composition proche du LCS physiologique (Tableau 4). Les tranches d'hippocampes restent dans ce réservoir à température ambiante pendant au moins 2h avant qu'une d'entre elle ne soit transférée dans une chambre d'enregistrement contenant du LCSa circulant à 6mL/min et chauffé à 28,7±1°C, permettant une oxygénation et une température optimale de nos tranches pendant 30min avant le début des enregistrements.

Tableau 4: Liste et concentration des différents éléments constituant la solution de coupe et le liquide cérébro-spinal artificiel (LCSa) normal et à faible Mg2+ (en mM).

	Concentration (mM)		
	Solution de coupe	LCSa	LCSa faible Mg^{2+}
NaCl	0	125	125
KCl	2	3	3
NaH_2PO_4	1,3	1,25	1,25
$NaHCO_3$	26	25	25
$MgCl_2$	6	1,3	0,1
$CaCl_2$	0,2	2,3	2,3
Glucose	10	10	10
Sucrose	220	0	0

5.2 Enregistrements des potentiels de champs

Pour tous les groupes, nous avons procédé à l'enregistrement des potentiels de champs de l'aire CA1 de l'hippocampe, zone étudiée pour ses capacités de plasticité (Bear and Malenka, 1994; Huerta and Lisman, 1995; Tsien, Huerta and Tonegawa, 1996; Katsuki, Izumi and Zorumski, 1997). Une électrode de stimulation bipolaire (SNEX-200x100mm, Phymep, France) a été placée au niveau des collatérales de Schaffer dans le *stratum radiatum* et reliée à un boitier de stimulation (Stimulus Isolator A360, WPI, Royaume-Uni). Le boitier est commandé par un générateur de courant (Accupulser A310, WPI, Royaume-Uni) et la stimulation consistait en des créneaux de courant de 0,1ms de durée et de fréquence variables en fonction des protocoles ainsi que de la phase de l'enregistrement et d'une intensité de stimulation allant de 60 µA à 600 µA. L'électrode d'enregistrement était constituée d'un fil d'argent glissé à l'intérieur d'un capillaire de verre étiré (HARVARD Apparatus 1,5mm O.D x 1,17mm ID, Phymep, France) rempli d'une solution de NaCl à 3M avec une résistance de 2 à 3MΩ. L'électrode est positionnée selon l'enregistrement souhaité dans le *stratum pyramidale*

pour enregistrer les potentiels de champs somatique (décharge synchrone d'un ensemble de neurones) ou dans le *stratum radiatum* pour enregistrer les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE), potentiels de champs dendritiques. Les signaux captés par l'électrode ont été amplifiés (x1000-2000, P511 AC AMPLIFIER, GRASS), filtrés (1Hz et 3kHz), transférés à un ordinateur via une interface micro 1401 (CED, Cambridge, Royaume Uni) et analysés à l'aide du logiciel de traitement de données Signal (CED, Cambridge, Royaume Uni). Les signaux ont été filtrés par un Hum Bug (Quest Scientific, Vancouver, Canada) permettant d'obtenir un enregistrement sans pollution électrique.

5.3 Protocoles expérimentaux

Les enregistrements commençaient par la recherche d'un signal permettant d'établir le positionnement de l'électrode à l'aide d'un micromanipulateur (NARISHIGE, Japan) en fonction de l'enregistrement souhaité, qu'il soit somatique ou dendritique (*stratum pyramidale* ou *radiatum* respectivement) (Figure 23). Une fois la position de l'électrode convenable et permettant d'obtenir un signal de bonne qualité, c'est-à-dire ne présentant pas de pollution électrique et affichant un décours temporel correct, la tranche d'hippocampe est stimulée à une fréquence de 0,2 Hz et une intensité de 400 µA jusqu'à stabilisation du signal en amplitude. Avant chaque expérience de plasticité, nous procédons à la réalisation d'une courbe intensité-réponse (Courbe I/O) qui va nous permettre d'apprécier l'état d'excitabilité de la tranche d'hippocampe et de déterminer sa réponse maximale. Cette courbe consiste en une augmentation de l'intensité de stimulation partant de 60 µA jusqu'à 600 µA, incrémentée de 20 µA, à une fréquence de 0,02 Hz. Seules les tranches présentant une réponse supérieure ou égale à 2,5mV d'amplitude pour les enregistrements somatiques sont conservées. Une fois le plateau de réponse maximale atteint, on détermine l'intensité de stimulation permettant d'obtenir 50-60% de la réponse maximale observée. Ensuite, nous enregistrons une ligne de base pendant au moins 20min afin d'observer une bonne stabilité avant de déclencher le protocole d'induction de la DLT. Les tranches ne présentant pas cette stabilité ont été exclues. Dans le cas des animaux pubères et adultes, le protocole de stimulation permettant d'induire une DLT consistait en une stimulation basse fréquence à impulsions appariées (*paired pulse Low Frequency Stimulation* ; ppLFS), une stimulation basse fréquence de 2 stimulations successives espacées de 200ms et répétées 900 fois à la fréquence de 1Hz (durée totale de

15min) que l'on appelle ppLFS 200-900. Pour les animaux prépubères, le protocole de stimulation utilisé était une LFS 900, soit 1 stimulation délivrée 900 fois à la fréquence de 1Hz (15min au total). Ce changement de protocole est nécessaire pour induire une DLT stable chez les animaux plus jeunes sans dégradation du signal. Ceci s'explique par le fait qu'en approchant de l'âge adulte, les protocoles de LFS sont moins efficaces à induire de la DLT, expliquant notre passage à une ppLFS 200-900, mais sont adaptés à des animaux de moins de 35 jours (Dudek and Bear, 1992; Kemp *et al.*, 2000).

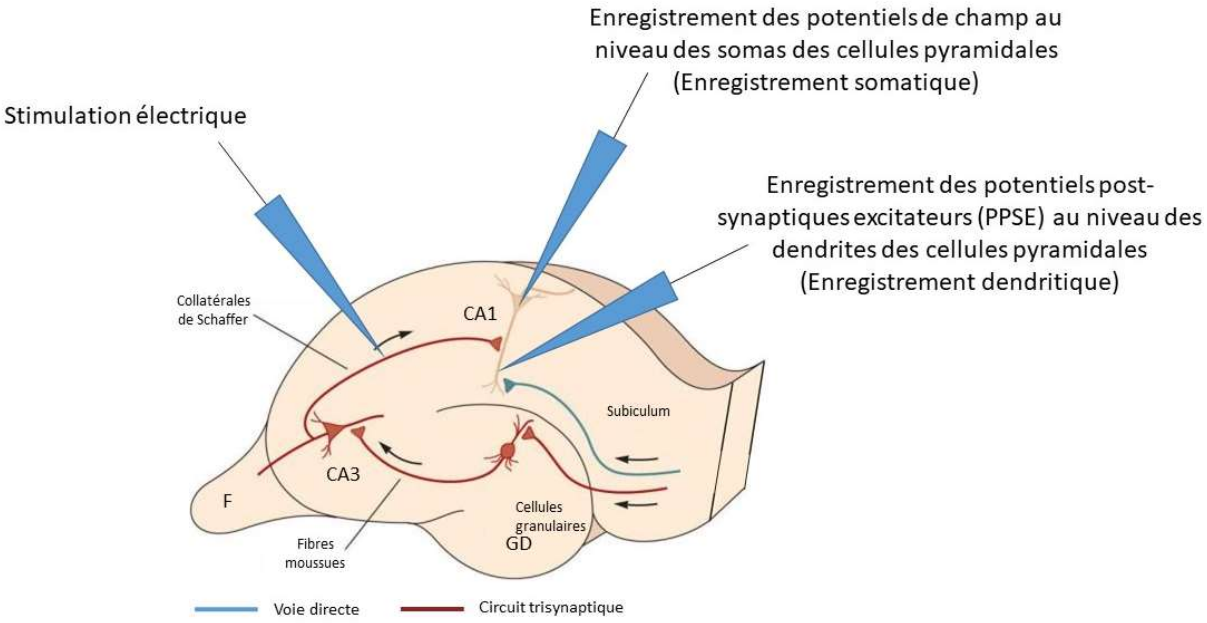


Figure 23: Représentation schématique de l'installation des électrodes en fonction des protocoles expérimentaux (enregistrement somatique ou dendritique) au niveau d'une tranche dorsale d'hippocampe.

Principle of Neural Science – Fifth Edition, p1491, adapté par Rabiant K.

Concernant l'enregistrement des PPSE, nous avons isolé le signal dépendant du seul récepteur au glutamate de type NMDA en travaillant dans un LCSa contenant une faible concentration de magnésium (voir Tableau 4). Cette faible concentration de magnésium permet de maintenir les récepteurs NMDA en conformation ouverte et donc rend notre système plus excitable. Une fois le signal dendritique obtenu et stabilisé, 50 µM de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA-A, et 10 µM de 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX), un antagoniste des récepteurs AMPA/Kainate, ont été ajoutés au LCSa. La

composition du LCSa à faible teneur en magnésium, associé à la présence de biccuculine et de CNQX permet d'obtenir un signal strictement lié au récepteur NMDA. Pour confirmer ceci, 20 µM d'acide DL-2-amino-5-phosphonopentanoïque (DL-AP5), un antagoniste des récepteurs NMDA, a été appliqué à la fin de l'enregistrement. Le rôle de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA a été évalué en utilisant 5 µM de Ro 25-6981, un antagoniste spécifique de cette sous-unité (Fischer *et al.*, 1997).

5.4 Mesures des signaux électrophysiologiques, analyses et statistiques

Pour les enregistrements somatiques, le signal correspondait à l'amplitude du potentiel de champ mesurée entre le point maximum du premier pic positif (représentant la volée afférente) et le point minimum du premier pic négatif (le potentiel de champ). Dans le cas des enregistrements des PPSE (*stratum radiatum*), c'est la pente du PPSE qui va nous permettre d'évaluer le signal. Il a été mesuré après la volée afférente au plus fort de la pente entre 2 points paramétrés à l'aide du logiciel d'acquisition Signal.

La durée des enregistrements a été en moyenne d'une heure et 20 minutes comprenant les 20 min de la ligne de la ligne de base, les 15min de protocole d'induction et les 45min à 60 min post-induction permettant d'apprécier ou non une plasticité au sein de l'hippocampe. La plasticité a été quantifiée en moyennant l'amplitude ou la pente mesurée au cours des 10 dernières minutes de l'enregistrement et en les comparant avec les 10 dernières minutes de la ligne de base avant déclenchement de la plasticité. Les valeurs obtenues ont subi une régression linéaire afin de s'affranchir de biais possibles provenant d'une ligne de base insuffisamment stable. Les résultats de plasticité sont exprimés en pourcentage de l'amplitude ou de la pente mesurée pendant la ligne de base. Les tests statistiques utilisés ont été l'ANOVA à deux voies lors d'une comparaison de 2 traitements (Effet éthanol, estradiol et interaction), l'ANOVA à une voie pour constater les effets d'un traitement, un test T de Student pour les comparaisons de moyenne entre deux groupes. Ces différents tests statistiques ont été complétés par un post-test de type Tukey. Dans tous les cas une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme significative.

Chapitre 3 : Résultats

Différence liée au sexe dans la vulnérabilité de la plasticité de l'hippocampe après une exposition à l'éthanol de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Implication de l'œstrogène

K. Rabiant, J. Antol, M. Naassila and O. Pierrefiche

Comme présenté dans ce manuscrit, la pratique du *binge drinking* pendant l'adolescence induit des dégradations de la mémoire et les jeunes femmes y sont plus sensibles que les jeunes hommes. Cependant, la raison pour laquelle cette différence existe reste indéterminée et le nombre d'études précliniques s'intéressant à cette question reste faible. Dans cette étude nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les niveaux d'œstrogènes endogènes (E2) pourraient expliquer cette différence liée au sexe dans les effets de l'éthanol sur la plasticité de l'hippocampe, le mécanisme cellulaire responsable de la mémoire. La dépression à long terme (DLT) dans des tranches d'hippocampe de rats femelles pubères a été enregistrée 24h après 2 *binge*s d'éthanol (EtOH : 3g/kg, v/v, i.p., avec 9h de délais) comme présenté dans le chapitre 2 : Matériels et méthodes. Nous avons ainsi étudié différents groupes expérimentaux en séparant d'une part les femelles en fonction de la phase de leur cycle ovarien, et d'autres part les rattes prépubères (ne présentant donc pas de cycle ovarien) et les rats mâles adolescents.

Concernant les femelles pubères, la réalisation de frottis vaginaux et leurs lectures sur état frais nous a permis de dépister le déroulement de leur cycle ovarien. Ainsi, nous avons effectué la première injection d'éthanol pendant deux périodes critiques, à savoir la phase de prœstrus, caractérisée par un pic d'œstrogènes endogènes, et les autres phases du cycle où le taux d'œstrogènes endogènes est faible. Tout d'abord nous avons effectué un enregistrement de la DLT chez les rattes en fonction de leur phase du cycle ovarien et nous n'avons pas observé de différence. Nous avons ensuite enregistré 24h après la première injection d'éthanol les potentiels de champs au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe. Nous avons observé une abolition de la DLT chez les rattes injectées pendant la phase de prœstrus tandis que les femelles injectées pendant les autres phases ne présentent pas d'altération de

leur capacité de plasticité. Ce premier résultat suggère une implication des œstrogènes dans les effets de l'éthanol sur la DLT (Figure 1 de l'article).

Pour pousser notre hypothèse selon laquelle une interaction EtOH/E2 serait responsable de l'abolition de la DLT dès 24h chez les rattes adolescentes, nous avons sélectionné des femelles en phases d'œstrus ou diœstrus (faible taux d'E2 endogène) et nous leur avons administré une injection concomitante d'EtOH et d'E2 (pour la méthodologie plus détaillée, voir chapitre 2 : Matériels et méthodes). Nous avons pu constater que lors de l'injection concomitante d'EtOH et d'E2, nous parvenions à abolir la DLT dès 24h, tandis que l'E2 exogène seul diminuait légèrement la DLT.

De plus, nous avons réitéré cette expérience chez des rattes prépubères, exemptes de cycle ovarien, et nous avons enregistré des résultats similaires, à savoir une abolition de la DLT 24h après les injections. Enfin, nous avons utilisé des rats pubères pour mesurer les effets d'une co-injection EtOH/E2 et nous avons observé, une fois encore, une abolition de la DLT 24h après les injections. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une interaction EtOH/E2 pouvant être responsable de l'abolition plus précoce de la DLT chez les rattes adolescentes (Figure 2 de l'article).

Nous nous sommes également intéressés aux effets de l'EtOH en fonction du cycle ovarien chez des rattes adultes. Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'observer un effet du cycle, du délais après traitement ou de l'EtOH chez ces animaux (Figure 3 A-B de l'article). Pour évaluer la différence de sensibilité des femelles vis-à-vis de l'éthanol, nous avons tenté d'obtenir une abolition de la DLT chez des rats mâles adolescents en augmentant la dose d'EtOH injectée. Pour rappel, notre précédente étude montrait une abolition de la DLT 48h après 2 *binges* d'EtOH (3g/kg, v/v, i.p.) chez des rats adolescents. Dans notre étude, nous avons mesuré une abolition de la DLT 24h après 2 *binges* d'EtOH à 3,75g/kg (v/v, i.p.), répliquant les résultats obtenus lors de la co-injection d'EtOH et d'E2. Ce résultat pourrait suggérer que la plus grande sensibilité des femelles vis-à-vis de l'éthanol pourrait être imputable à la présence d'E2 chez les rattes adolescentes (Figure 3 C – H).

Concernant les mécanismes d'action, nous nous sommes tout d'abord intéressé par le mode d'action des œstrogènes. Nous avons utilisé le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes ERα et ERβ. Avec la dose utilisée (10mg/kg), le tamoxifène a une action antagoniste sur les récepteurs aux œstrogènes mais sans effet cognitif. Ainsi, nous

avons pu observer l'effet d'une injection i.p. de tamoxifène (Tam) sur la DLT. Nous avons enregistré que le Tam seul n'a pas d'effet sur la DLT. De plus, l'injection de Tam permet de prévenir l'inhibition de la DLT produite par l'E2. Ensuite, nous avons injecté le Tam tout de suite après la co-injection EtOH/E2, nous avons observé la présence d'une DLT signifiant que le Tam permet de prévenir l'abolition de la DLT causé par l'interaction EtOH/E2, 24h après le traitement. Cependant, à 48h le Tam n'a pas d'effet. Nous avons observé une abolition de la DLT 48h après 2 *binges* d'éthanol chez des rattes injectées pendant une phase à faible taux d'E2 endogène Cette abolition est toujours présente lorsque le Tam est injecté après la co-injection EtOH/E2. Ces résultats suggèrent l'implication des récepteurs aux œstrogènes dans les mécanismes responsables de l'abolition de la DLT 24h après un double *binge* (Figure 4 de l'article).

Enfin, concernant l'implication des récepteurs NMDA, nous avons voulu observé si la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA était impliquée dans les mécanismes d'abolition de la DLT chez les rattes pubères. Nous avions précédemment observé que les rats adolescents recevant 2 *binges* d'éthanol présentaient une augmentation de l'efficacité de la Ro25-6981, un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B, sur les PPSE-NMDA. De la même manière, nous avons observé une augmentation de l'efficacité de la Ro25-6981 dans les groupes où l'E2 et l'EtOH sont présents en même temps. Ainsi, les rattes exposées à l'EtOH pendant la phase de prœstrus, mais également les rattes recevant une co-injection EtOH/E2, présentent toutes une augmentation de l'efficacité de l'antagoniste de la sous-unité GluN2B. Ainsi, tout comme chez les rats adolescents, la sous-unité GluN2B serait impliquée dans l'abolition de la DLT après deux *binges* d'éthanol chez les femelles pubères (Figure 5 de l'article).

Ainsi, l'E2 pourrait expliquer la plus grande vulnérabilité des femelles par rapport aux mâles vis-à-vis des atteintes de la plasticité synaptique de l'hippocampe induite par l'éthanol. Cette augmentation de la vulnérabilité chez les rats femelles pourrait être due à des changements dans la composition des récepteurs NMDA en faveur d'une augmentation des GluN2B, cible commune entre l'éthanol et l'E2.

Publication de thèse

Sex difference in the vulnerability to hippocampus plasticity impairment after binge-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key?

K. Rabiant, J. Antol, M. Naassila and O. Pierrefiche

INSERM, UMR 1247 GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Univ Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Chemin du Thil, 80025 Amiens cedex 1, France

Declarations of interest: none

Corresponding author : O. PIERREFICHE

INSERM UMR 1247 Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances

Centre Universitaire de Recherche en Santé

Chemin du Thil - CHU-Amiens Sud-F-80025 Amiens

Phone: (0033) (0)3-22-82-79-32

E-mail: olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Number of words in abstract: 250

Number of words in the main text: 4582

Number of figures: 5

Number of table: 0

Supplemental information: material and methods and 3 figures

Abstract

Binge drinking during adolescence induces memory impairments and evidences suggest that females are more vulnerable than males. However, the reason for such a difference is unclear while preclinical studies addressing this question are lacking. Here we tested the hypothesis that endogenous estrogen level (E2) may explain sex differences in the effects of ethanol on hippocampus plasticity, the cellular mechanism of memory. Long-term depression (LTD) in hippocampus slice of pubertal female rats was recorded 24h after two ethanol binges (3g/kg, i.p., 9h apart). Neither the estrous cycle nor ethanol altered LTD. However, if ethanol was administered during proestrous (i.e., at endogenous E2 peak), LTD was abolished 24h later whilst NMDA-fEPSPs response to a GluN2B antagonist increased. Such abolition of LTD was not observed in more adult female rats. Exogenous E2 combined with ethanol replicated LTD abolition in pubertal, pre-pubertal female and in pubertal male rats. In male rats, a higher dose of ethanol was required to abolish LTD at 24h delay. In pubertal female rats, tamoxifen, an antagonist of estrogen receptors, blocked the impairing effects of exogenous E2 on LTD, suggesting that estrogen interacts with ethanol through changes in gene expression. In addition, tamoxifen prevented LTD abolition at 24h but not at 48h delay. In conclusion, estrogen may explain the increased vulnerability to ethanol-induced plasticity impairment seen in females compared with males. This increased vulnerability of female rats is likely due to changes in the GluN2B subunit that represent a common target between ethanol and estrogen.

Keywords: Estrogen, synaptic plasticity, hippocampus, ethanol, female, memory, adolescent

1. Introduction

A recent national survey in France indicates that 86% people at the age of 17 years[1] experienced alcohol at least once, that 2/3 of them had drank at least one time during the month prior to the survey and that 40% had drank 5 drinks (50g pure ethanol) in one occasion over the same period. These figures are close to those for USA[2]. Although 17 years-old boys are 3 times more numerous than girls in consuming alcohol in France[1], girls are more prone to start drinking earlier in life than boys[3,4]. Furthermore, binge drinking becomes more prominent in girls[5,6] while women experience a more rapid progression of alcohol addiction than men[7]. Women present also a higher rate of alcohol-related diseases[8] and are suffering more than men from ethanol-induced neurotoxicity and cognitive impairments, suggesting a higher vulnerability of female brain to ethanol[9-12]. Biological factors that may contribute to such higher vulnerability include sex-related factors such as ethanol pharmacokinetics, ethanol effects on brain function and the level of sex hormones[13]. For example, an association has been found between estrogen levels and alcohol use in females in both clinical and preclinical studies [13-15]. One of the effects of ethanol in adolescents/young adults is memory impairments, which is stronger than in adults. Memory loss, called “blackout”, a kind of temporary anterograde amnesia[16] is frequently experienced by teenagers[16] and, one predictive factor of “blackout” experiences is female sex[16] which is in accordance with a higher vulnerability of female to ethanol-induced cognitive impairment[9,12]. Preclinical studies described ethanol-induced memory impairments in males or females[17-20], with a possible role of estrogen in female[21,22]. However, there is a lack of demonstration that higher vulnerability to memory impairments in female rodents includes a role for circulating estrogen. Estrogen is acknowledge as a promnesiant hormone facilitating long-term synaptic potentiation (LTP) in rodent hippocampus and increasing learning[23,24]. However, the mode of action of estrogen is mixing rapid and delayed effects. Estrogen via intracellular receptors (i.e., ERα and ERβ) plays the role of nuclear transcription factors. Estrogen also acts via several non-classical mechanisms including interaction with other membranous receptors such as the G-protein-coupled estrogen receptor (GPER), or metabotropic and ionotropic glutamatergic receptor[24]. Among these targets, estrogen increases GluN2B-containing NMDA receptor current and mRNA levels[23] while GluN2B protein or level of phosphorylation were neither increased[25], leading to the suggestion that estrogen recruits GluN2B-containing NMDA receptor at the synapse. In our previous study performed in adolescent/young adult male rats, we measured

an overexpression of GluN2B 48h after two binge-like ethanol exposures[26] while LTD (Long-term Depression) was blocked leading to cognitive deficit[20]. Therefore, we tested whether estrogen modulates ethanol-induced LTD abolition after binge-like ethanol exposure in female rats. We postulated that the estrogen effect on GluN2B-containing NMDA receptors combined with that of ethanol should lead to a complete and more rapid collapse of LTD in females than in males. Our results showed that the estrus cycle has no effect on hippocampus LTD but that an interaction between estrogen and ethanol alter hippocampus plasticity. Thus female rats are more vulnerable to ethanol than males because of the presence of estrogen in the context of few episodes of ethanol intoxication.

2. Materials and methods

Experiments were performed in agreement with the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals (2010/63/UE, CE Off. J. 20 October 2010) and the French decree no. 2013-118 (French Republic Off. J., 2013). All experimental procedures receive an agreement from the ethic committee of Région Picardie (CREMEAP) under the experimental number 3829.

2.1 Animals

Female Sprague-Dawley rats (Charles River, France) were studied at pre-pubertal (21-25 days, without vaginal opening), post-pubertal (35-45 days old, in presence of a vaginal opening) and adult age (200-250 days). We studied male rats during puberty (35-45 days old).

2.2 Determination of the estrous cycle

After the observation of a vaginal opening, a vaginal smear was followed by cytology analysis. Proestrus was determined with epithelial cells, oestrus by cornified squamous cells, metoestrus with similar proportion of leucocytes, cornified and epithelial cells and, dioestrus by the predominance of leucocytes[27-29].

2.3 Ethanol and pharmacological treatments

Post-pubertal female rats received 2 i.p. injections of ethanol (3g/kg; 20%v/v) given 9h apart[20,26] in the different phases of the estrous cycle. Recording was performed 24 or 48h later. Estrogen (17β-estradiol, E2; Sigma-Aldrich, Sweden) was dissolved in sesame oil and administered at 180µg/kg (i.p.), according to the literature [30,31], alone, or only once before the first ethanol injection to mimic the single peak of E2 during a spontaneous estrous cycle. The level of E2 is probably supraphysiologic as the treatment was in addition to the physiology of the intact animals we used. I.p. injection of ethanol never disturbed the estrous cycle while E2 ip injection never triggered a proestrous phase 24h later. 50mM stock solution of tamoxifen (HelloBio, Bristol, UK), was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The tested dose (10mg/kg, i.p. with 5% DMSO) is ineffective on cognitive functions while estrogen receptors blockade remains efficient[32]. In separate experiments, males received two binges at 3.75g/kg ethanol.

2.4 Blood ethanol content (BEC)

BEC was measured at 0.5h after the first injection, 9h later before the second injection, and 24h after the first injection[20]. Blood samples were collected from the sublingual vein, collected and centrifuged at 14000g for 5min. The supernatant was frozen at -80°C and analyzed with an oxygen-rate alcohol analyzer (Analox Instruments, London, UK).

2.5 Hippocampus slice and electrophysiology

Procedures were described elsewhere[20]. After decapitation under isoflurane anesthesia, the brain was immersed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) composed of (mM): Sucrose, 220; KCl, 2 NaH_2PO_4, 1.3; $NaHCO_3$, 26; $MgCl_2$, 6; $CaCl_2$, 0.2; Glucose, 10). 400 µm thick Hippocampus slices were stored 2 h in carbogen-gassed aCSF (95% O_2/5% CO_2; pH 7.2-7.4; room temperature) composed of (mM): NaCl, 125; KCl, 3; NaH_2PO_4, 1.25; $CaCl_2$, 2.3; $MgCl_2$, 1.3; $NaHCO_3$, 25; glucose, 10) and transferred to a recording chamber perfused at 6mL/min. Recordings were made with 3M NaCl (1-3MΩ) filled glass microelectrode into the CA1 area while Schaffer collaterals were stimulated at 0.05Hz (square pulse, duration 100µs). An input/output curve was established for each slice. Test intensity was set to 50-60% of the maximum. LTD induction changes according to the age of the animals[33]. Thus, in post-

pubertal animals LTD was induced with a 1Hz pLFS200-900 stimulation whereas in pre-pubertal animals, a 1Hz LFS900 protocol was used[33]. NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (NMDA-fEPSPs) were recorded into the *stratum radiatum* with an aCSF containing no Mg^{2+}, 20µM bicuculline, and 10µM 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX). At the end of recording, 50µM DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5) was applied. EPSP's slope was measured just after the afferent volley. Five µM Ro 25-6981 (Sigma Aldrich, Sweden), a GluN2B subunit antagonist [34] was tested on NMDA-fEPSPs. Signals were amplified (x1000-2000), filtered (1-3kHz), and acquired on computer with Signal software (CED, Cambridge, UK). Measurements were averaged every minute. "N = " is the number of animals and "n = " the number of slices.

2.6 Statistics and Data Presentation

Statistics were performed on raw data for each slice (i.e., "n"). All results are expressed as percent change relative to baseline value (mean ± SEM). One-Way or Two-Way ANOVA followed by post-hoc Tukey test was performed when both normality test and equality of variance were confirmed. For group comparison, a Student's t-test was used when our groups followed a normal distribution, or a Mann-Whitney test when normality failed. In all test, we chose $P<0.05$ as significant. Effect size was calculated as follows: [Mean of experimental group]-[Mean of control group] / Standard deviation pooled from both group] with NaCl in $Low_{[E2]}$ as control.

3. Results

3.1 Blood Ethanol Content

In post-pubertal females, BEC reached 316.6 ± 8.2mg/dL 30min after the first EtOH injection (3g/kg, i.p.), 37.2 ± 10.5mg/dL 9h later and 10.6 ± 1.1mg/dL at 24h. Pre-pubertal females showed a BEC of 342.8 ± 14.0mg/dl at 30min post-injection, 4.5 ± 0.8 at 9h and 5.3 ± 0.7 the next day. BEC at 9h and at 24h were lower in pre-pubertal than in post-pubertal female animals ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively). In adult females, BEC was 339.1 ± 6.5 at +30 min, 4.5 ± 0.8 at +9h and 4.7 ± 0.9 at 24h, which was lower compared to post-pubertal rats ($P<0.05$).

3.2 Effects of ethanol on long-term depression (LTD) during the oestrous cycle in post-pubertal females

To analyse the modulatory effects of the oestrous cycle on ethanol's effects, we separated the females in two groups. The first group called $High_{[E2]}$, corresponds to the proestrus where estrogen concentration is the highest. The second group called $Low_{[E2]}$, compiled the other phases during which oestrogen level is always lower than during proestrus. LTD was recorded 24h after pharmacological treatments performed either in $High_{[E2]}$ or in $Low_{[E2]}$ phases. A two-way ANOVA revealed an effect of EtOH ($F_{(1,29)}$ = 42.6, P<0.001), of the $High_{[E2]}$ or $Low_{[E2]}$ phase ($F_{(1,29)}$ = 29.5, P<0.001) and an interaction ($F_{(1,27)}$ = 23.8, P<0.001). Post-hoc analysis (Tukey test) showed that when NaCl was injected during $High_{[E2]}$, the amplitude was similar than in $Low_{[E2]}$ phase (NaCl in $Low_{[E2]}$: 44.7 ± 3.5%, n = 9; N = 7, *vs* NaCl in $High_{[E2]}$: 47.2 ± 3.8%, n = 7, N = 5, P>0.05; Fig. 1C). Furthermore, ethanol in $Low_{[E2]}$ had no effect on LTD (EtOH in $Low_{[E2]}$: 52.2 ± 4.5%, n = 9, N = 6, P>0.05 compared to NaCl; Fig. 1A1-A2). In contrast, when EtOH was injected in $High_{[E2]}$, LTD was abolished 24h later (EtOH in $High_{[E2]}$: 99.2 ± 6.5%, n = 6, N = 5, P<0.001 compared to NaCl in $High_{[E2]}$; Fig. 1B1-B2). Thus, EtOH in $High_{[E2]}$ had stronger effects than EtOH in $Low_{[E2]}$ (EtOH in $High_{[E2]}$: 99.2 ± 6.5% *vs* EtOH in $Low_{[E2]}$: 52.2 ± 4.5%, P<0.001 between groups ; Fig. 1D). Figure 1E shows the compiled data. The effect size for each condition was 0.6 for EtOH in $Low_{[E2]}$, 0.25 for NaCl in $High_{[E2]}$ and 1.8 for EtOH in $High_{[E2]}$. We checked the effects of EtOH injected 24h before proestrus with a recording performed in $High_{[E2]}$ (EtOH in $Low_{[E2]}$; Rec in $High_{[E2]}$), analysed by a t-test. Here, signal amplitude reached 54.6 ± 4.4% (n = 5, N = 5), a value similar to EtOH in $Low_{[E2]}$ (P>0.05 between groups; Suppl. Fig. 1B). Hence, LTD was abolished at 24h delay only when ethanol was injected during $High_{[E2]}$ phase, suggesting an important role of the estrogen peak at the time ethanol was injected.

3.3 Exogenous estrogen, ethanol and LTD in post-pubertal female rats

To check the consequence of high level of estrogen (E2) on ethanol effects, we replicated our result using exogenous E2 administered during the $Low_{[E2]}$ phase in post-pubertal females

(Fig.2A,B). Two-Way ANOVA showed a significant effect of EtOH ($F_{(1,26)}$ = 13.1, P = 0.001), of exogenous E2 ($F_{(1,26)}$ = 46.3, P<0.001) with an interaction ($F_{(1,24)}$ = 5.02, P = 0.035). Post-hoc revealed that E2 alone, slightly but significantly decreased LTD by 16% (E2: 66.9 ± 3.5%, n = 10, N = 7, P<0.05 compared to control: 49.5 ± 3.0%, n = 6, N = 4, Fig. 2A-2B; effect size: 1.34, Suppl. Fig. 1C1). EtOH alone had no effect (EtOH: 54.8 ± 3.6%, n = 7, N = 5, P>0.05 compared to control; effect size: 0.61, Suppl. Fig. 1C2). In contrast, co-injection of E2+EtOH abolished LTD (EtOH+E2: 89.4 ± 4.5%, n = 5, N = 4, P<0.001 compared to EtOH group; effect size: 1.8, Fig. 2A,B). T-test analysis revealed no differences between EtOH+E2, and EtOH in $High_{[E2]}$ (EtOH+E2: 89.4 ± 4.5%, *vs* EtOH in $High_{[E2]}$: 99.2 ± 6.5%, P>0.05 between groups, Suppl. Fig. 3).

3.4 Ethanol and estrogen in absence of oestrous cycle

To further demonstrate a link between ethanol and E2, we tested these substances in pre-pubertal females and in pubertal male rats. In pre-pubertal female, two-way ANOVA revealed an effect of EtOH ($F_{(1,21)}$ = 4.5, P = 0.047), of E2 ($F_{(1,21)}$ = 7.552, P = 0.013) and an interaction ($F_{(1,19)}$ = 3.536, P = 0.075). Post-hoc test showed a control level of LTD reaching 66.8 ± 6.5% of baseline (n = 6, N = 4, P<0.05; Fig. 2C) and no difference between E2 treated pre-pubertal females and controls (E2: 71.6 ± 0.7%, n = 5, N = 3, P>0.05; effect size: 0.41, Fig. 2C, D; Suppl. Fig. 1D1). Similarly, EtOH alone had no effect (EtOH: 68.1 ± 3.5%, n = 6, N = 5, P>0.05 compared to control; effect size: 0.1, Fig. 2D; Suppl. Fig. 1D2). However, co-administration of EtOH+E2 abolished LTD (EtOH+E2: 94.0 ± 7.6%, n = 6, N = 5, P<0.05 compared to control; effect size: 1.24; Fig. 2C, D). This effect was different from EtOH alone (P=0.003) or E2 alone (P=0.013; Fig. 2D). In pubertal male rats (Fig. 2E, F), two-way ANOVA revealed an effect of EtOH (F(1,22) = 12.8, P = 0.002), an effect of E2 (F(1,22) = 7.3, P = 0.014) and an interaction (F(1,20) = 5.4, P = 0.031). Post-hoc analysis showed that, compared to control, E2 alone had no effect (E2: 55.7 ± 3.8%, n = 5, N = 2, P>0.05; effect size 0.23; Fig. 2E, F) and EtOH alone had no effect (EtOH: 60.0 ± 7.0%, n = 6, N = 2, P>0.05; effect size 0.46; Fig. 2E, F) but that E2+EtOH abolished LTD (EtOH+E2: 84.7 ± 4.8%, n = 6, N = 3 *vs* control: 53.8 +/- 3.%, n = 7, N = 5, P<0.001; effect size 1.66, Fig. 2E,F).

3.5 Age and sex differences in the response to ethanol

We measured the effects of 3g/kg ethanol in 150-200 days old female rats to confirm a particular effect of ethanol during post-pubertal period. We found that in adult female rats that EtOH in $Low_{[E2]}$ did not alter LTD at 24h (NaCl in $Low_{[E2]}$: 49.3 ± 4.1%, n = 5, N = 3 *vs* EtOH in $Low_{[E2]}$: 47.0 ± 5.3%, n = 8, N = 4, P>0.05, t-test between groups ; Fig 3A, B) as well as EtOH during $High_{[E2]}$ (EtOH in $High_{[E2]}$: 49.4 ± 6.0%, n = 4, N = 3, P>0.05, t-test compared to control; Fig. 3A,B). Further measurements at 48h delay revealed no alteration of LTD (NaCl in $Low_{[E2]}$: 49.3 ± 4.1% *vs* EtOH in $Low_{[E2]}$: 54.5 ± 6.8%, n = 7, N = 3, P>0.05, t-test between groups; Fig. 3A,B). Hence, puberty in female rats is a highly sensitive period regarding the response to ethanol. The results obtained in post-pubertal female rats showed an abolition of LTD 24h after two binge-like ethanol exposures (3g/kg) whereas in young adult male rats, this effect occurred at 48h delay[20], suggesting a difference in sensitivity to EtOH of post-pubertal female rats. We checked whether the difference in the delay of LTD abolition was due to the higher BEC of post-pubertal female rats. We thus treated young adult male rats with a higher dose of ethanol (3.75g/kg) and found that LTD was abolished at 24h delay (NaCl in male: 53.8 ± 3.1%, n = 7, N = 4, *vs* EtOH 3.75g/kg: 89.3 ± 3.3%, n = 7, N = 5, P<0.05, t-test, Fig. 3C, D). Importantly, there was no differences between male and female LTD in control (NaCl in male: 53.8 ± 3.1% *vs* NaCl in $High_{[E2]}$: 47.2 ± 3.8%, n = 7, N = 5, P>0.05, t-test, Fig. 3E,F). Furthermore, LTD abolition was similar between the 3.75g/kg EtOH treated males and post-pubertal female rats injected with 3g/kg EtOH in proestrus (EtOH 3.75g/kg in male: 89.3 ± 3.3% *vs* EtOH in $High_{[E2]}$: 99.2 ± 6.5%, P>0.05, t-test, Fig. 3G,H). These results demonstrate that a higher dose of EtOH in male is required to abolish LTD 24h later. However, besides a higher BEC, only the combination of high oestrogen and ethanol in post-pubertal female rats was responsible for LTD abolition at 24h, suggesting the involvement of oestrogen receptors in this effect.

3.6 Testing tamoxifen on ethanol and E2 effects on LTD

To evaluate the role of oestrogen receptors (ERs) in LTD abolition at 24h delay in post-pubertal female rats, we used tamoxifen (10mg/kg, i.p.) co-injected with either E2 or EtOH+E2 applied in $Low_{[E2]}$ in order to avoid the endogenous peak of E2. ANOVA revealed an effect of E2 treatment ($F_{(1, 33)}$ = 4.2, P = 0.048), no effect of tamoxifen ($F_{(1, 33)}$ = 0.0002, P = 0.9) and an interaction ($F_{(1, 31)}$ = 9.5, P = 0.004). Tamoxifen alone had no effect on LTD (NaCl in $Low_{[E2]}$: 44.7

± 3.5%, n = 9; N = 7 *vs* Tam: 55.4 ± 3.5 %, n = 6, N = 3, P>0.05; Fig. 4A, D). E2 alone slightly decreased LTD (Fig. 4B, D and Supp. Fig. 1C1) and tamoxifen prevents this effect (NaCl in $Low_{[E2]}$: 44.7 ± 3.5% *vs* E2+Tam: 54.5 ± 5.6%, n = 8, N = 4, P>0.05; Fig. 4B, D). Tamoxifen partly reduced LTD abolition 24h after EtOH+E2 (EtOH + E2: 89.4 ± 4.5%, n = 5, N = 4 *vs* EtOH+E2+Tam: 63.3 ± 4.5%, n = 7, N = 3, P<0.01; Fig. 4C, D). Thus, both the decrease of LTD 24h after E2 alone and LTD abolition 24h after EtOH+E2 involved oestrogen receptors. To discriminate further the role of E2 and EtOH in LTD abolition, we measured whether the protective effect of tamoxifen lasted over 48h. In these conditions, a Two-way ANOVA showed that EtOH alone in $Low_{[E2]}$ almost abolished LTD in female rats at 48h (EtOH in $Low_{[E2]}$: 85.3 ± 8.0%, n = 4, N = 3; Fig. 4E, F). Interestingly, at this time point, tamoxifen's preventive effect was not present since LTD abolition persisted (EtOH+E2+Tam @ 24h: 63.3 ± 4.5%, n = 7, N = 3 *vs* EtOH+E2+Tam @ 48h: 113.6 ± 4.1%, n = 5, N = 3, P<0.001; t-test; Fig. 4E, F). However, in this series of experiment we still found a preventive effect of tamoxifen at 24h delay (EtOH in $Low_{[E2]}$ @24h: 52.2 ± 4.3%; n = 9, N = 6 vs EtOH+E2+Tam @24h: 63.3 ± 4.5%, n = 7, N = 3, P>0.05; Fig. 4E, F). ANOVA revealed here a main effect of treatment (E2+Tam treatment effect: $F_{(1,21)}$ = 13.569, P = 0.001), a main effect of time ($F_{(1,21)}$ = 60.580, P<0.001) and an interaction ($F_{(1,21)}$ = 2.569, P = 0.124).

3.7 Analysis of NMDA-fEPSPs:

To evaluate further the mechanisms of action of ethanol and E2, we investigated the role of the GluN2B subunit by measuring the inhibition of the NMDA-fEPSP slope with bath application of Ro 25-6981, 24h after i.p. pharmacological treatment. The two-way ANOVA showed an effect of EtOH ($F_{(1,23)}$ = 16; P<0.001), an effect of E2 ($F_{(1,23)}$ = 6.2, P = 0.021) and an interaction ($F_{(1,21)}$ = 8.1, P = 0.01). Ro 25-6981 had similar effects in control group (NaCl: 7.86 ± 1.85%, n = 7, N = 5) than in E2 group (E2 in $Low_{[E2]}$: 7.00 ± 1.97%, n = 6, N =5, P>0.05) and EtOH group (EtOH in $Low_{[E2]}$: 10.72 ± 2.1%, n = 5, N = 4, P<0.01; Fig. 5A,B). In contrast, Ro 25-6981 showed an effect after EtOH+E2 in $Low_{[E2]}$ (23.92 ± 3.47%, n = 7, N = 4, Fig. 5A,B) and this effect was significantly different from E2 in $Low_{[E2]}$ group (P<0.001 between groups; Fig. 5A,B). When EtOH was injected in $High_{[E2]}$, Ro 25-6981 showed a stronger and similar effect that when it was tested in EtOH+E2 in $Low_{[E2]}$ group (EtOH in $High_{[E2]}$: 19.34 ± 2.95%, n = 5, N= 3 *vs* EtOH+E2 in $Low_{[E2]}$: 23.92 ± 3.47%, n = 7, N = 4, P>0.05 between groups; t-test; Fig. 5C). The

effect size for Ro 25-6981 was similar in EtOH in $High_{[E2]}$ group and in EtOH+E2 in $Low_{[E2]}$ group (1.47 *vs* 1.44). Such effect size was more important than for E2 (E2 in $Low_{[E2]}$ group : -0.18) or ethanol (EtOH in $Low_{[E2]}$ group: 0.64), revealing that Ro 25-6981 is more effective in reducing NMDA-fEPSP slope only in conditions that blocked LTD.

4. Discussion

We showed that hippocampus LTD is abolished in post-pubertal female rats 24h after two binge-like ethanol exposures only when high level of ethanol is concomitant to high level of oestrogen. This abolition is accompanied with an increase in NMDA-fEPSPs sensitivity to a GluN2B antagonist. The mechanisms of LTD abolition involved oestrogen receptors but also ethanol *per se* through a synergic action that leads to a rapid and continuous abolition over 48h post-treatment. Interestingly, for a same dose of ethanol than males, post-pubertal female rats appeared particularly responsive to ethanol because LTD in adult female was insensitive to ethanol and because LTD abolition in post-pubertal female appeared 24h earlier than in males. We conclude that the higher vulnerability of LTD to ethanol in post-pubertal female rats is due to an interaction between oestrogen and ethanol likely through pathways altering GluN2B.

4.1 Oestrous cycle and hippocampus plasticity

We used gonadally intact female rats to study oestrogen in a physiological environment. Although this method provides a more apt comparison to intact male population, it requires to test the different phases of the oestrous cycle. We monitored the female cycle and considered only two main conditions according to the level of circulating oestrogen that is, the proestrous phase (i.e., high oestrogen concentration) and the three other phases (i.e., low oestrogen concentration). LTD was not modulated by the oestrous cycle in both post-pubertal and adult female rats since LTD magnitude was similar in all phases of the cycle and at both ages. Unfortunately, there is a lack of literature regarding the influence of the oestrous cycle on LTD while only few studies concern LTP, the other plasticity signal involved in memory formation. LTP in CA1 area *in vivo* was facilitated during proestrous while LTD was restrained compared to other phases[35]. Similarly, LTP was stronger in the afternoon of the proestrous[36-

[38]. Differences with our study may come from the type of experiment (i.e., *in vivo vs in vitro*), the strain of animals, the electric stimulation used or the brain area studied. Nonetheless, there is yet no consensus regarding the influence of the oestrous cycle on learning and memory (including on cellular signals related to these cognitive processes). Even more, the oestrous cycle does not probably lead to more variability in females relative to males[24, 39]. More studies are definitely needed to know better about modulation of LTD in the hippocampus and the role of the oestrous cycle.

4.2 Ethanol, oestrogens and LTD

Two binge-like ethanol exposure was performed during the different phases of the oestrous cycle in order to demonstrate the modulatory role of ethanol on LTD in presence or absence of estrogen and, to compare with our previous study performed in young adult male rats[20]. In females, ethanol did not disrupt LTD 24h after treatment when applied during endogenous low estrogen phases, suggesting no role for either low or high concentration of endogenous estrogen at the time of recordings on ethanol's effects on LTD. In contrast, LTD was abolished 24h after an ethanol treatment during the high estrogen phase (i.e., proestrous). Thus, estrogen concentration was high enough during proestrous to modulate the effects of ethanol on LTD, suggesting an interaction between high level of circulating estrogen and high level of ethanol in modulating LTD magnitude the day after. This assumption is supported by the replication of this result using exogenous estrogen. More precisely, LTD was not abolished in post-pubertal female rats treated with E2 during low estrogen phases but the combination of ethanol and E2 during these phases abolished LTD 24h latter. We also found an abolition of LTD in pre-pubertal female rats which do not have an oestrous cycle, only when E2 was combined with ethanol. Finally, treating young adult male rats revealed again an abolition of LTD at 24h only when E2 and ethanol were injected at the same time. Because none of the substances tested alone had an effect on LTD, we suggest a synergic action of E2 and ethanol to abolish LTD at 24h delay. This idea is supported by comparing the effect size of the drugs alone and in combination. In all cases, the combination of drugs induced a stronger effect than the simple addition of each drug effects. Furthermore, the higher effect size always accompanied the blockade of LTD and NMDA-fEPSPs analysis showed a similar result (see below). Since we did not check if E2 administration may affect ethanol metabolism we cannot

rule out a potential interaction, but this seems unlikely because ethanol is mainly metabolized in the liver via CYP2E1 enzyme while 80% of the estrogen is degraded via hepatic CYP1A2 and CYP3A4 enzymes[52, 53]. Thus, the common part of the metabolism pathways concerns only a small proportion of the substances.

4.3 Mechanism of early LTD abolition in female rats

Analysis of NMDA-fEPSPs revealed that the effectiveness of a GluN2B antagonist increased in animals treated with ethanol and E2, or if ethanol treatment occurred during proestrous. Although the results with Ro25 are correlational and not causal between alterations in NMDAR subunit composition and deficits in LTD, this suggests a possible role of the GluN2B subunit in all conditions which abolished LTD 24h later. This result is in accordance with our previous report in male[20], suggesting a common mechanism of LTD abolition between male and female rats although it occurred earlier in female. Our result obtained in males was recently confirmed by measuring an increase in the expression of the GluN2B subunit in CA1 area of the hippocampus 48h after ethanol, when LTD was abolished[26]. Interestingly, 24h after an E2 treatment in female rats, GluN2B mRNA and GluN2B-containing NMDA receptor current in CA1 increase as well as binding sites and synaptic location of this subunit[40]. However, whether E2 effects were due to a recruitment of GluN2B-containing NMDA receptors at the synapse with or without an increase in GluN2B expression or in NMDA receptors phosphorylation is still not yet clear[23,25,41,42]. In this context, it is possible that the effects of E2 and of ethanol on GluN2B subunits and/or on GluN2B containing NMDA-receptors current added to each other, leading to a faster abolition of LTD compared to male rats[20]. Furthermore, LTD abolition at 24h in male was obtained only with ethanol + E2 treatment, supporting further the notion of a synergic action between the two substances. Interestingly, E2 converts chemically induced NMDA-LTD into LTP[43], suggesting that E2 may abolish NMDA-dependent LTD. In addition, E2 suppressed or reduced NMDA-dependent LTD induction in old and in adult rats[44]. Importantly, such inhibitory effects of E2 is not found regarding mGlu-R related LTD[43,45].

Oestrogen activates cytoplasmic α and β receptors (i.e., ERα and ERβ) which act as nuclear transcription factors. In ERα and Erβ receptors knock-out adult male mice[46], oestrogen treatment increases LTD in hippocampus slice[47,48]. In our conditions, LTD abolition at 24h in

female rats after ethanol + E2 treatment was partly prevented by tamoxifen, suggesting that at least part of the effects is linked to E2 receptors. Tamoxifen can act either as an agonist or an antagonist. However, we took care to choose a dosage of tamoxifen previously shown to antagonize estrogen effects without affecting cognitive function[32]. Interestingly, when recordings were extended to 48h, LTD was abolished in all females treated with ethanol alone while tamoxifen was not protective. Because the LTD impairing effect of E2 is blocked by tamoxifen, the estrogen effects are likely due to changes in gene expression, although E2 may act rapidly through E2 membrane-bound receptors to modulate phosphorylation of some receptors. Thus, it is very likely that estrogen contributes to the impairing effects of ethanol on LTD through changes in GluN2B expression and/or potentiates an increase in GluN2B expression by ethanol. Altogether, our study suggests that estrogen's effects through ERα and ERβ recruits GluN2B containing NMDA receptors and that ethanol increases GluN2B subunit production in a parallel manner. As such, early abolition of LTD in female rats is possibly due to the addition of these two effects. In consequence, blocking estrogen receptors with tamoxifen abolished the effects of ethanol + E2 treatment whereas ethanol alone does not alter LTD at 24h, similarly to male rats. Beside the above possible mechanisms, we previously showed in male rats that our binge-like paradigm increased both HDAC activity and HDAC2 levels in the hippocampus[26]. Interestingly, ovariectomy induces similar epigenetic changes[54], suggesting that the combination of exogenous E2 and ethanol would counteract each other at the level of epigenetic processes. In this way, we may hypothesize that abolition of LTD with combined ethanol and E2 does not involved the same epigenetic processes as in males. However, this latter option would require specific investigations.

4.4 Adolescent female rats are particularly vulnerable to ethanol

The modulatory effects of the oestrous cycle on ethanol binge was present in post-pubertal but not in more mature female rats, revealing that adolescence/young adult period is critical in terms of ethanol's effects on brain functioning. This is in accordance with several studies, which however, concerned LTP in male rodents[17,49-51]. Our result also suggests that endogenous oestrogen does not modulate similarly the effects of ethanol at these two ages. Nonetheless, if the period of adolescence is critical for the effects of ethanol in female rats, are female rats more sensitive to ethanol than males? In comparison with young adult male,

LTD in female was abolished 48h later after ethanol like in male, suggesting there is no sex difference in sensitivity to ethanol. This lack of difference was observed despite a higher BEC in female. However, an earlier abolition of LTD (24h) occurred in female rats in presence of high oestrogen during the peak of ethanol. In males, a similar early abolition of LTD was obtained with a higher dose of ethanol (3.75g/kg instead of 3g/kg) leading to similar BEC than in females treated with 3g/kg ethanol. This would suggest in contrast, that there is no higher sensitivity to functional alteration of plasticity in the hippocampus in female rats compared to males. Nonetheless, abolition of LTD at 24h in males was also obtained with an E2 treatment combined with 3g/kg ethanol. This result reveals that the sex difference in response to ethanol is not only due to a difference in BEC after similar ethanol dose but also to the presence of oestrogen. Moreover, LTD was not abolished at 24h in female rats treated with ethanol during low endogenous oestrogen phases; an effect similar to male rats despite a higher BEC in female. Globally, these results suggest that part of female's sensitivity to ethanol is due to the presence of high circulating level of oestrogen.

4.5 Conclusion

At similar dose of ethanol than males, female rats present more rapid alterations of hippocampus plasticity related to learning and memory because of the presence of high oestrogen level. Circulating oestrogen in females is probably a vulnerability factor in the induction of deleterious effects of ethanol on cognitive functions through changes in GluN2B expression and or functioning. Oestrogen hormone should be viewed as part of the mechanisms of a putative increased vulnerability of females to ethanol effects.

Authors CRediT roles: ***Rabiant K*** : Data curation, Methodology, Formal analysis, Investigation, Validation; ***Antol J***: Technical assistance; ***Naassila M:*** Funding acquisition, Writing/Review and Editing; ***Pierrefiche O****:* Writing the original draft, Writing/Review and Editing, Visualization, Conceptualization, Supervision, Project Administration

Funding and Disclosure

This work has been supported by Université de Picardie Jules Verne, the French ministry of Research which financed the PhD position of K.R. and INSERM organization.

Acknowledgments

The authors would like to thank the “PlatAnn” facility of the University for providing technical support.

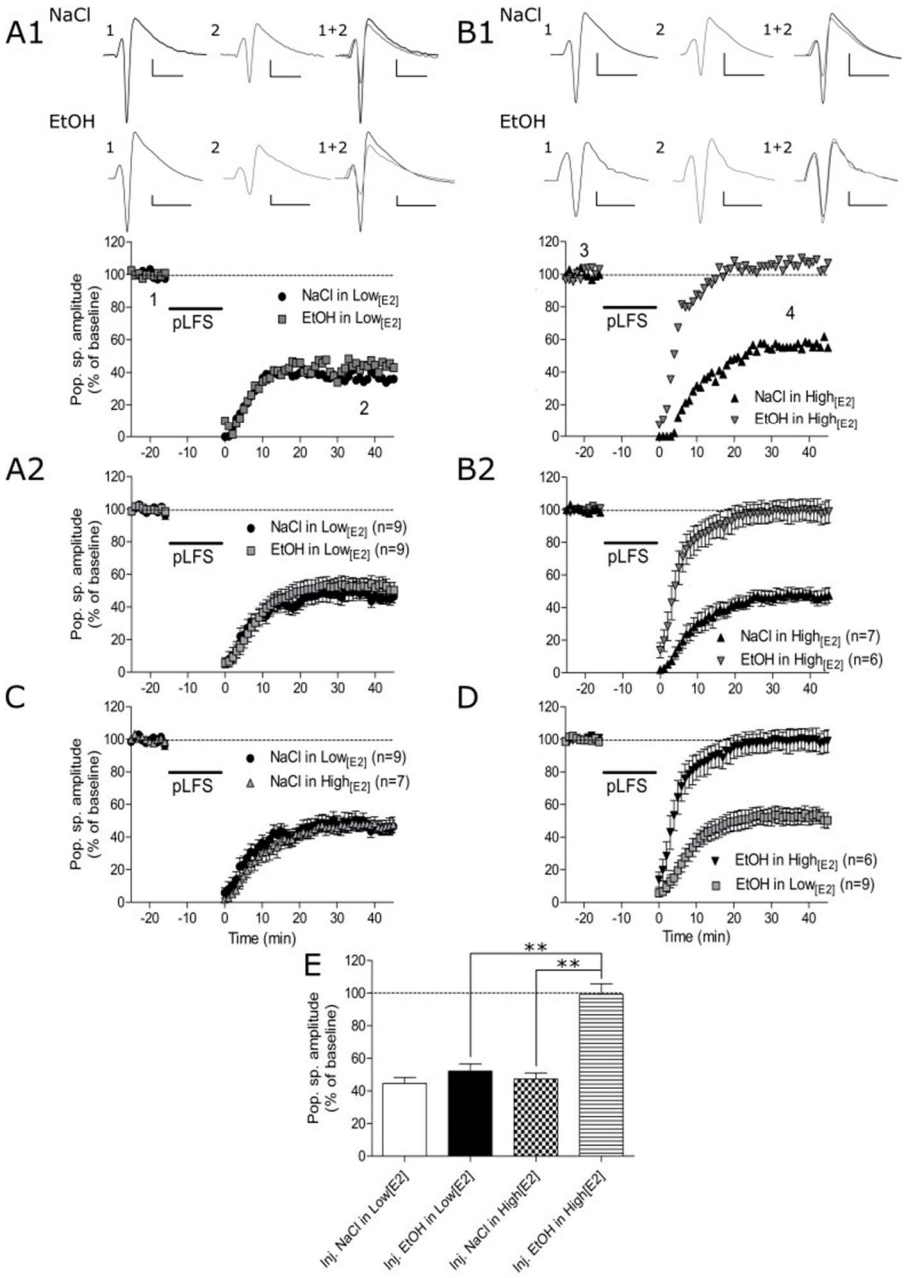


Figure 1. **Effects of two-ethanol exposures (3g/kg i.p.) on hippocampus LTD according to the estrous cycle in post-pubertal female rats. (A1)** Unitary recording of LTD 24h after ethanol treatment in $Low_{[E2]}$ phase. Top: averaged raw signals at time points illustrated in A1 (1, 2). **(A2)** Same conditions but for the whole group of slices. **(B1)** Unitary recording of LTD after ethanol injected in $High_{[E2]}$ phase showing an abolition of LTD at 24h delay. Top: averaged raw traces at time point in B1 (3, 4). **(B2)** The whole group of slices tested in $High_{[E2]}$ phase. **(C)** LTD recorded in NaCl animals treated either in $Low_{[E2]}$ or $High_{[E2]}$ phases of the estrous cycle. **(D)** Comparison of LTD measured when ethanol was injected in $Low_{[E2]}$ phase or in $High_{[E2]}$ phase. **(E)** Results obtained in the different experimental conditions with 100 % as baseline signal amplitude measured before the induction of LTD. ***P < 0.001 and NS stands for nonsignificant. Calibration bars for averaged top traces are 0.2 mv and 100 ms.

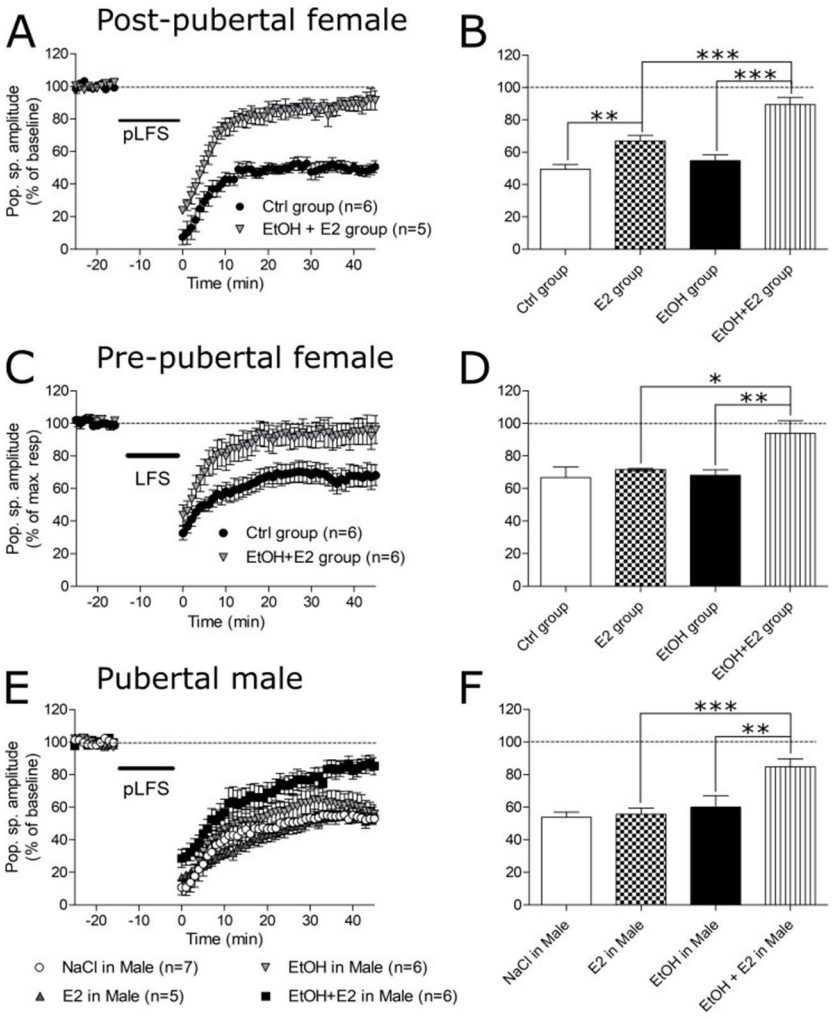


Figure 2. Exogenous E2 with ethanol in female and male rats. (A) In post-pubertal females, ethanol and E2 co-applied in $Low_{[E2]}$ phase abolished LTD 24 h later. **(B)** Statistics for post-pubertal female rats 24 h after treatments. E2 alone slightly but significantly decreased LTD and ethanol alone had no effect. **(C)** In pre-pubertal females, co-injection of E2 and ethanol abolished LTD at 24 h delay. **(D)** Statistics for pre-pubertal females at 24 h. E2 and ethanol alone had no effect. **(E)** In post-pubertal males, E2 and ethanol had no effect on LTD but co-injection of ethanol and E2 decreased significantly LTD 24 h after treatment. **(F)** Statistics for panel E. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Ctrl group refers to control animals injected with saline and sesame oil.

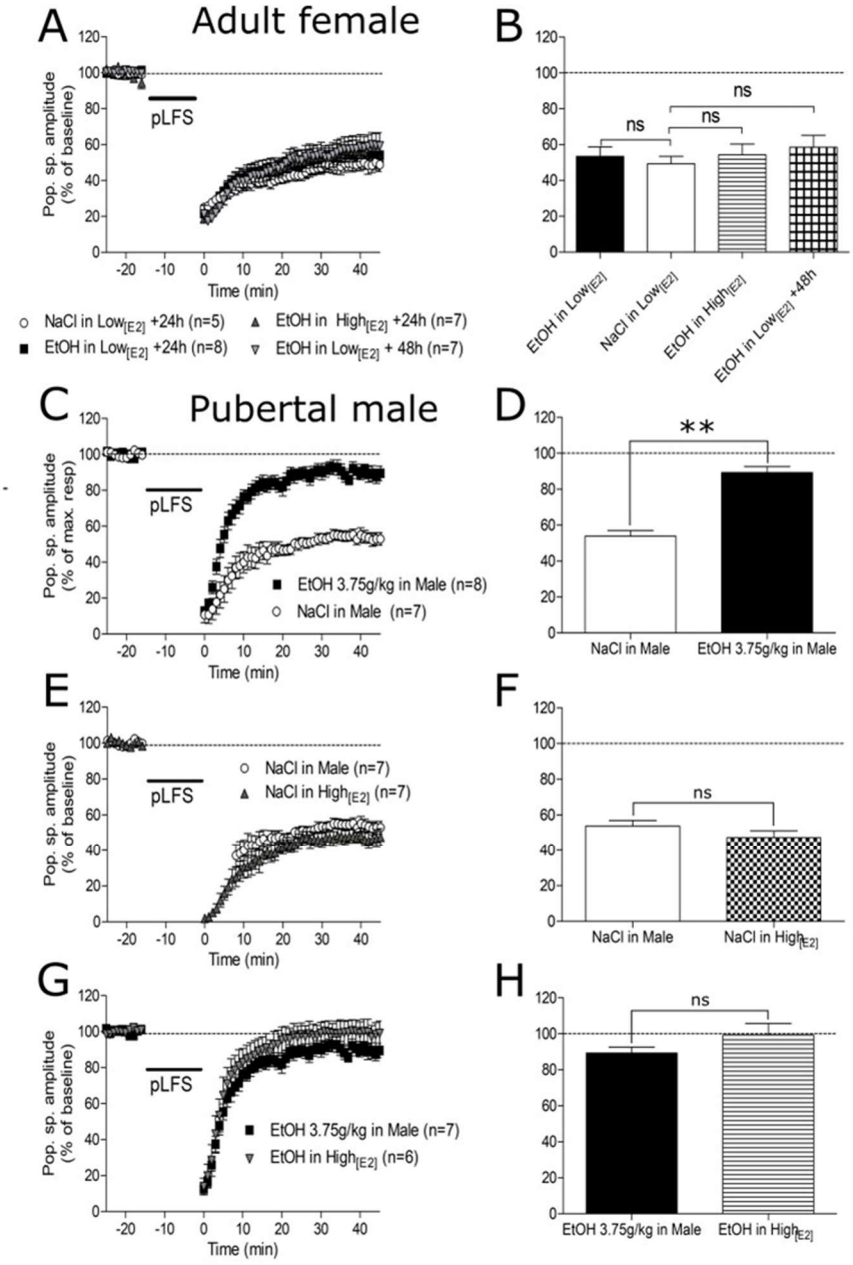


Figure 3. **Difference in sensitivity to ethanol between post-pubertal males and in adult female rats**. **(A)** In 150-200 days old adult female rats, neither the estrus cycle nor the delay after treatment nor ethanol altered LTD. **(B)** Statistics for the adult female groups. **(C)** In post-pubertal male rats LTD was abolished 24 h after 2 binges of ethanol at the dose of 3.75g/kg. **(D)** Statistics for the males in C. **(E)** Controls (NaCl) in both post-pubertal male and post-pubertal female rats showed no difference in LTD. **(F)** Statistics for NaCl treated animals in E. **(G)** LTD was similarly abolished in post-pubertal males treated with 3.75g/kg ethanol and in post-pubertal females treated in $High_{[E2]}$ phase at 3g/kg ethanol. **(H)** Statistics for the groups in G. **P < 0.01, ns stands for nonsignificant.

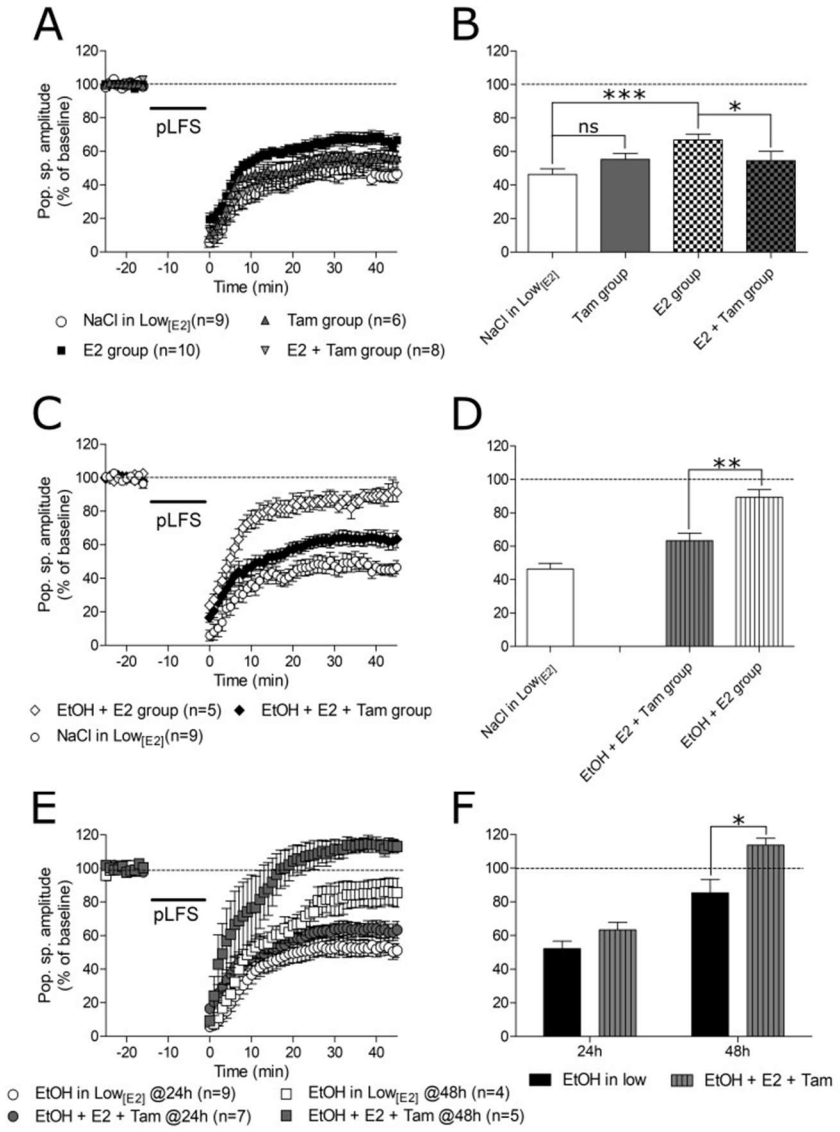


Figure 4. Effect of tamoxifen on ethanol and E2-induced hippocampal plasticity impairment. **(A)** Tamoxifen alone (10mg/kg) does not alter LTD 24h after treatment whereas it prevented the inhibitory effect of E2 on LTD magnitude. **(B)** Statistics for the groups in A. **(C)** Tamoxifen injected alongside EtOH + E2 prevents LTD abolition at 24 h delay. **(D)** Statistics for the groups in C. **(E)** 24 h after ethanol in $Low_{[E2]}$, LTD was present (white circle) and tamoxifen prevented LTD blockade after ethanol + E2 treatment (grey circles). At 48 h delay, ethanol alone abolished LTD in females (white square) and tamoxifen did not prevent such abolition (grey square). **(F)** Statistics for experiments in E. *P<0.05, **P < 0.01, ***P<0.001.

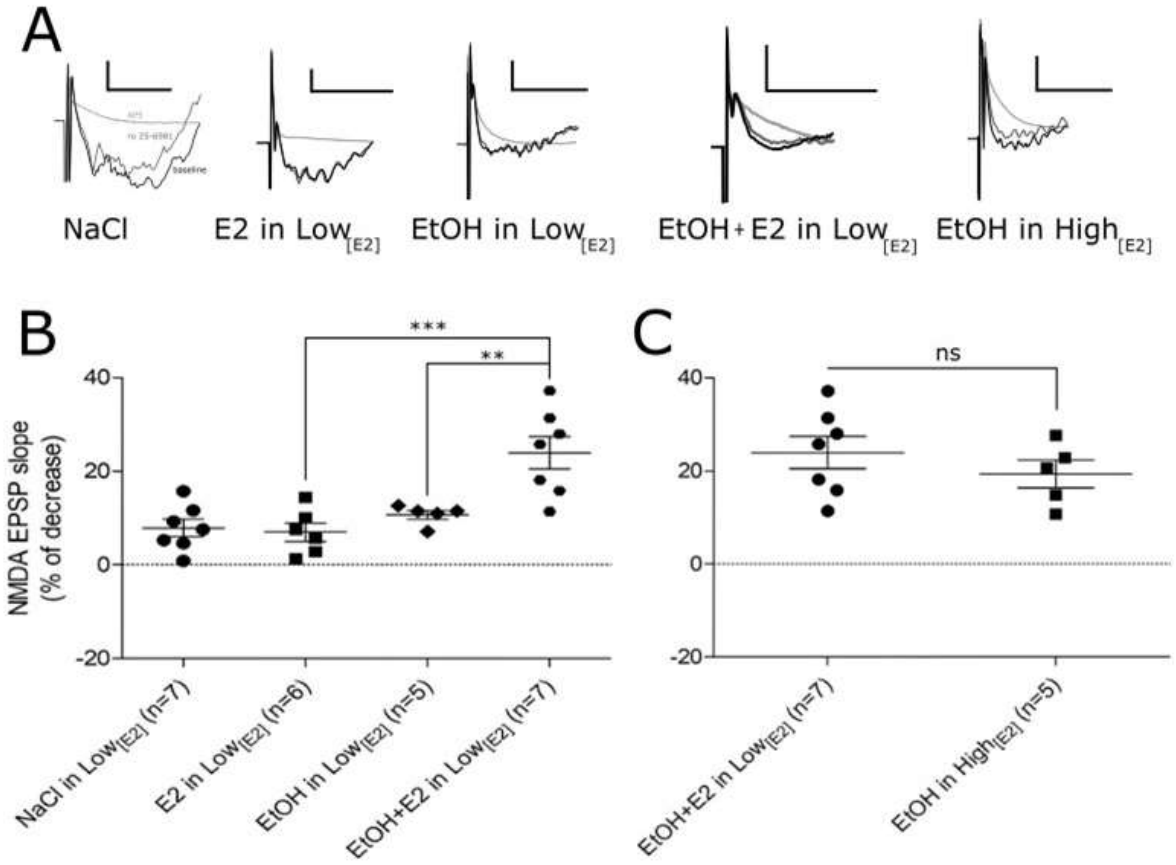


Figure 5. NMDA-fEPSPs responses to Ro 25-6981. (A) Unitary recording of NMDA-fEPSPs for each conditions. Calibration bars are 10 ms for time and 0.05 mV for amplitude. **(B)** Quantification of Ro 25-6981 effects on NMDA-fEPSP slope in post-pubertal female rats treated with EtOH, E2 or both in $Low_{[E2]}$ phase. **(C)** Ro 25-6981 has the same effectiveness when EtOH was applied in the $High_{[E2]}$ phase than when ethanol was concomitantly applied with exogenous E2 in $Low_{[E2]}$ phase. **P < 0.01, ***P < 0.001, ns = nonsignificant.

Reference

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request

[1] OFDT, Juin 2019, tendances n°132. https://www.ofdt.fr/publications/collections/periodiques/lettre-tendances/usages-dalcool-de-tabac-et-de-cannabis-chez-les-adolescents-du-secondaire-en-2018-tendances-132-juin-2019/

[2] Johnston LD, Miech RA, O'Malley PM, Bachman JG, Schulenberg JE, Patrick ME. Monitoring the Future National Survey results on Drug Use, 1975-2017: Overviews, Key Findings on Adolescent Drug Use. 2018. Institute for Social Research, The University of Michigan, Ann Harbor.

[3] Cheng HG, Chandra M, Alcover KC, Anthony JC. Rapid transition from drinking to alcohol dependence among adolescent and young-adult newly incident drinkers in the United States, 2002-2013. *Drug Alcohol Depend* 2016;168:61-68.

[4] Vinader-Caerols C, Talk A, Montañés A, Duque A, Monleón S. Differential Effects of Alcohol on Memory Performance in Adolescent Men and Women with a Binge Drinking History. *Alcohol Alcohol* 2017;52:610-616.

[5] Keyes KM, Grant BF, Hasin DS. Evidence for a closing gender gap in alcohol use, abuse, and dependence in the United States population. *Drug Alcohol Depend* 2008;93:21-29.

[6] White A, Castle IJ, Chen CM, Shirley M, Roach D, Hingson R. Converging Patterns of Alcohol Use and Related Outcomes Among Females and Males in the United States, 2002 to 2012. *Alcohol Clin Exp Res* 2015;39:1712-1726.

[7] Ait-Daoud N, Blevins D, Khanna S, Sharma S, Holstege CP. Women and Addiction. *Psychiatr Clin North Am* 2017;40:285-297.

[8] Wilsnack SC, Wilsnack RW, Kantor LW. Focus on: women and the costs of alcohol use. *Alcohol Res* 2013;35:219-28.

[9] Caldwell LC, Schweinsburg AD, Nagel BJ, Barlett VC, Brown SA, Tapert SF. Gender and adolescent alcohol use disorders on BOLD (blood oxygen level dependent) response to spatial working memory. *Alcohol Alcohol* 2005 May-Jun;40(3):194-200.

[10] Hashimoto JG, Wiren KM. Neurotoxic consequences of chronic alcohol withdrawal: expression profiling reveals importance of gender over withdrawal severity. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:1084-1096.

[11] Wilhelm CJ, Hashimoto JG, Roberts ML, Bloom SH, Andrew MR, Wiren KM. Astrocyte Dysfunction Induced by Alcohol in Females but Not Males. *Brain Pathol* 2016;26:433-451.

[12] Smith KW, Gierski F, Andre J, Dowell NG, Cercignani M, Naassila M, Duka T. Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern. *Addict Biology* 2017;22:490-501.

[13] Erol A, Ho AM, Winham SJ, Karpyak VM. Sex hormones in alcohol consumption: a systematic review of evidence. *Addict Biology* 2019;24:157-169.

[14] Ford MM, Eldridge JC, Samson HH. Microanalysis of ethanol self-administration: estrous cycle phase-related changes in consumption patterns. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:635-643

[15] Priddy BM, Carmack SA, Thomas LC, Vendruscolo JC, Koob GF, Vendruscolo LF. Sex, strain, and estrous cycle influences on alcohol drinking in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2017;152:61-67.

[16] Schuckit MA, Smith TL, Heron J, Hickman M, Macleod J, Munafo MR, Kendler KS, Dick DM, Davey-Smith G. Latent trajectory classes for alcohol-related blackouts from age 15 to 19 in ALSPAC. *Alcohol Clin Exp Res* 2015;39:108-116.

[17] Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:416-421.

[18] Sircar R, Sircar D. Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1402-1410.

[19] Sircar R, Basak AK, Sircar D. Repeated ethanol exposure affects the acquisition of spatial memory in adolescent female rats. *Behav Brain Res* 2009; 14;202:225-231.

[20] Silvestre de Ferron B, Bennouar KE, Kervern M, Alaux-Cantin S, Robert A, Rabiant K, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Two Binges of Ethanol a Day Keep the Memory Away in Adolescent Rats: Key Role for GLUN2B Subunit. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015 6;19

[21] Sircar R.Estrogen Modulates Ethanol-Induced Memory Deficit in Postpubertal Adolescent Rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2019;43:61-68

[22] Satta R, Hilderbrand ER, Lasek AW. Ovarian Hormones Contribute to High Levels of Binge-Like Drinking by Female Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2018;42:286-294.

[23] Vedder LC, Smith CC, Flannigan AE, McMahon LL. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus* 2013;23:108-15.

[24] Frick KM. Molecular mechanisms underlying the memory-enhancing effects of estradiol. *Horm Behav* 2015;74:4-18.

[25] Snyder MA, Cooke BM, Woolley CS. Estradiol potentiation of NR2B-dependent EPSCs is not due to changes in NR2B protein expression or phosphorylation. *Hippocampus* 2011;21:398-408.

[26] Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, Alary R, Peineau S, Gosset P, Sueur H, Marcq I, Debuysscher V, Naassila M, Vilpoux C, Pierrefiche O.Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addict Biol*ogy 2019 ; 6:e12760.

[27] Yener T, Turkkani Tunc A, Aslan H, Aytan H, Cantug Caliskan A. Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: how reliable? *Anat Histol Embryol* 2007;36:75-77

[28] CH Hubscher, DL Brooks & JR Johnson. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 2005;80:79-87

[29] C.C. Paccola1, C.G. Resende, T. Stumpp, S.M. Miraglia, I. Cipriano. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod* 2013;v.10, n.4:677-683.

[30] Isaksson IM, Theodorsson A, Theodorsson E, Ström JO. Methods for 17β-oestradiol administration to rats.. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:583-592.

[31] Ström JO, Theodorsson E, Theodorsson A. Order of magnitude differences between methods for maintaining physiological 17beta-oestradiol concentrations in ovariectomized rats. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:814-822.

[32] Lichtenfels M, Dornelles ADS, Petry FDS, Blank M, de Farias CB, Roesler R, Schwartsmann G. The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha. *J Neural Transm (Vienna)* 2017;124(11):1331-1339.

[33] Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci* 2000;12:360-366

[34] Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E, Heitz MP, Kemp JA. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1285-1292

[35] Good M, Day M, Muir JL.Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 1999;11:4476-4480.

[36] Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 1995;12:26-30.

[37] Galvin C, Ninan I. Regulation of the mouse medial prefrontal cortical synapses by endogenous estradiol. *Neuropsychopharmacology* 2014;39:2086-2094.

[38] Sabaliauskas N, Shen H, Molla J, Gong QH, Kuver A, Aoki C, Smith SS. Neurosteroid effects at α4βδ GABAA receptors alter spatial learning and synaptic plasticity in CA1 hippocampus across the estrous cycle of the mouse. *Brain Res* 2015;1621:170-186.

[39] Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 2014;40:1-5.

[40] Smith CC, Smith LA, Bredemann TM, McMahon LL. 17β estradiol recruits GluN2B-containing NMDARs and ERK during induction of long-term potentiation at temporoammonic-CA1 synapses. *Hippocampus* 2016;26:110-117.

[41] Cyr M, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T. Estrogen-like activity of tamoxifen and raloxifene on NMDA receptor binding and expression of its subunits in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:242-257

[42) Adams MM, Fink SE, Janssen WG, Shah RA, Morrison JH. Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J Comp Neurol* 2004 28;474:419-426.

[43] Shiroma S, Yamaguchi T, Kometani K. Effects of 17beta-estradiol on chemically induced long-term depression. *Neuropharmacology* 2005;49:97-102.

[44] Vouimba RM, Foy MR, Foy JG, Thompson RF. 17beta-estradiol suppresses expression of long-term depression in aged rats. *Brain Res Bull* 2000;53:783-787

[45] Desmond NL, Zhang DX, Levy WB.Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult, ovariectomized rat. *Neurobiol Learn Mem* 2000;73:180-187.

[46] Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T, Kawato S. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res* 2015;1621:133-146.

[47] Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Res Rev* 2008;57:363-375.

[48] Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 2007;100:950-967.

[49] Swartzwelder HS, Wilson WA, Tayyeb MI.Age-dependent inhibition of long-term potentiation by ethanol in immature versus mature hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:1480-1485.

[50] Pyapali GK, Turner DA, Wilson WA, Swartzwelder HS. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol* 1999;19:107-111.

[51] White AM, Ghia AJ, Levin ED, Swartzwelder HS. Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1251-1256.

[52] Meskar A, Plee-Gautier E, Amet Y, Berthou F, Lucas D. [Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1]. *Pathol Biol (Paris)*. 2001;49:696-702. Article in French.

[53] Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* 2005;227:115-124.

[54] Aggarwal A, Sharma N, Sandhir R, Rishi V. S-nitrosoglutathione prevents cognitive impairment through epigenetic reprogramming in ovariectomised mice. *Biochem Pharmacol.* 2019;168:352-365.

Supplemental information

Sex difference in the vulnerability to the hippocampus plasticity impairment due to binge-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key?

K. Rabiant, J. Antol, M. Naassila and O. Pierrefiche

INSERM, UMR 1247 GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Univ Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Chemin du Thil, 80025 Amiens cedex 1, France

Materials and methods

Experiments were performed in agreement with the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals (2010/63/UE, CE Off. J. 20 October 2010) and the French decree no. 2013-118 (French Republic Off. J., 2013). All experimental procedures receive an agreement from the ethic committee of Région Picardie (CREMEAP) under the experimental number 3829.

Animals

Male and female Sprague-Dawley rats (Charles River, France) were tested. Female rats were studied during pre-pubertal period (21-25 days; 80-120 gr) or during late adolescent/early adulthood periods (35-45 days old; 200-250 gr), or at adult age (200-250 days; > 300 gr) (Schneider, 2013). Male rats were studied during puberty at 35-45 days old.

Determination of the estrous cycle

To take into account the influences of the estrous cycle on the effects of ethanol, we performed a fresh vaginal smear followed by cytology analysis to identify the phase of the cycle in which we either recorded synaptic plasticity or injected the pharmacological treatment. A disposable plastic pipette filled with 200µl of saline was gently introduced into the vagina. Then, we flushed several times the saline solution until a cloudy solution was

obtained which was collected inside a 0.5mL Eppendorf. For cytology analysis, the smear was place on a hemocytometer without any coloration. Cell counting was performed under an optic microscope (Nikon Optiphot, Japan). Determination of the cycle phase was based upon published literature describing the different types of cells present during the different phase of the estrus cycle (Yener and al., 2007; Hubscher and al., 2009; Paccola and al., 2013). More precisely, proestrus was determined by the predominant presence of epithelial cells (round and nucleated cells), estrus phase was identified by the predominant presence of cornified squamous cells (aggregated and arranged in layers), metestrus was confirmed by the presence of the similar proportion of leucocytes, cornified and epithelial cells and, finally diestrus phase was validated by the predominance of leucocytes.

Ethanol exposure and pharmacological treatments

Female rats received 2 i.p. injections of ethanol (3g/kg ; 20% v/v) given 9 hours apart (Silvestre de Ferron et al., 2015) in the different phase of the estrous cycle. Recording was performed the day after (24 h delay). In some experiments, we tested the effects of exogenous estrogen (17β-estradiol, i.p., named E2 throughout the text) with a dosage of 180 µg/kg (Sigma-Aldrich Sweden AB, CAS No. [50-28-2]) dissolved in sesame oil (Sigma-Aldrich Sweden AB, CAS No. [8008-74-0]). This E2 dose and way of administration was chosen according to the literature (Isaksson et al., 2011; Strom et al., 2008) and because it evoke a minimal but significant effect on LTD magnitude (see result section). E2 was administered before ethanol. Adult female rats (150-200 days) were also tested with 2 i.p. injections of ethanol (3g/kg ; 20% v/v) given 9 hours apart on LTD magnitude during endogenous estrous cycle and with exogenous estrogen. Male rats received 2 i.p. injections of ethanol (3.75g/kg; 20% v/v) given 9 hours apart. Control groups included age-matched animals injected with either saline, sesame oil or both concerning experiments in female, or injected with saline concerning experiments with male.

Blood ethanol content (BEC)

BEC was measured in female animals as previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015): 0.5 hour after the first injection, 9 hours later before the second injection and 24 hours after the first injection. After light anesthesia, blood samples were collected from the sublingual

vein and collected in vials (0.5-1 mL) and centrifuged at 14 000g for 5 – 10 minutes. The supernatant was collected, frozen at -80°C and analyzed with an oxygen-rate alcohol analyzer (Analox Instruments, London). Animals were placed under observation and warm light until they woke up.

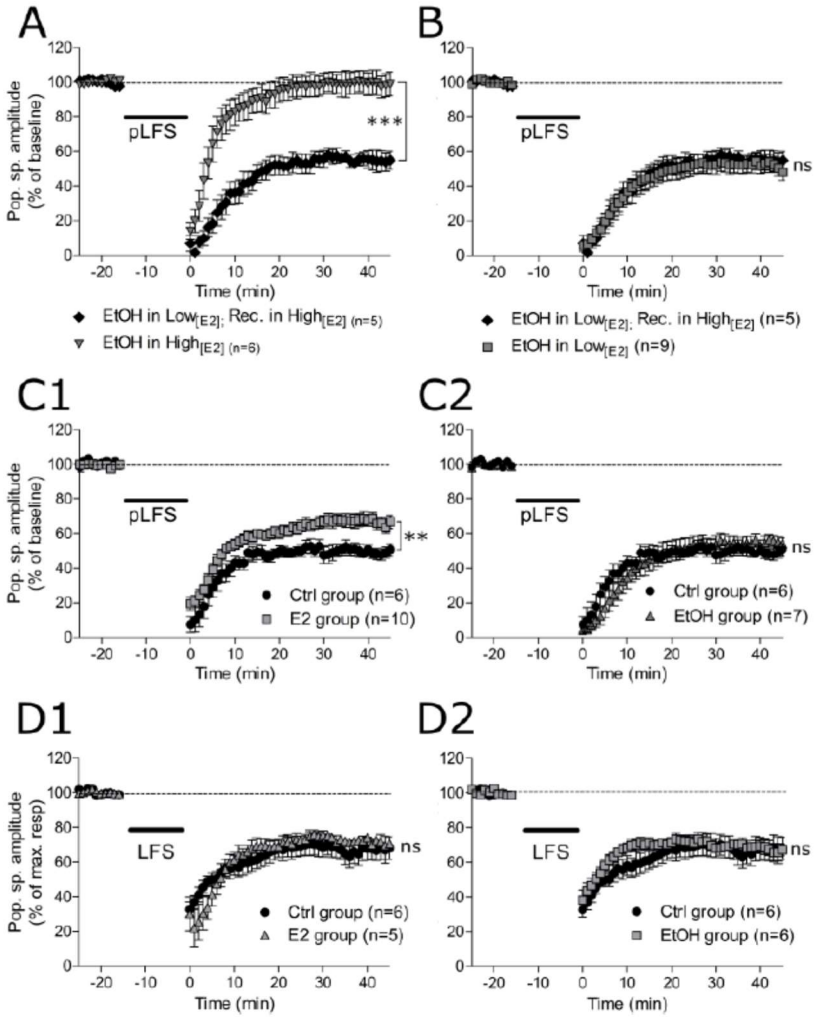
Hippocampus slice and electrophysiology

Procedure were described elsewhere (Silvestre de Ferron et al., 2015). Briefly, animals were decapitated and the brain was immersed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) of the following composition (mM): Sucrose, 220; KCl, 2 NaH_2PO_4, 1.3; $NaHCO_3$, 26; $MgCl_2$, 6; $CaCl_2$, 0.2; Glucose, 10. Rostral part of the brain and cerebellum were removed. The remaining of the brain was glued into a vibratome (Leica VT1200S), and slices from dorsal hippocampi (thickness: 400µm) were obtained. Selected slices were stored 2 hours in an aCSF reservoir gassed with carbogen (95% O_2/5% CO_2; pH 7.2-7.4; room temperature) of the following composition (mM) : NaCl, 125; KCl, 3; NaH_2PO_4, 1.25; $CaCl_2$, 2.3; $MgCl_2$, 1.3; $NaHCO_3$, 25; glucose, 10. Hippocampus slices were transferred to a recording chamber perfused at a continuous rate of 6mL/min. Extracellular recordings were made with 3M NaCl (1-3 MΩ) filled glass microelectrodes placed into the pyramidal cell body layer of CA1. Electrical stimulation (A365, WPI) of the Schaffer collateral-commissural afferent pathway using a bipolar stimulating electrode (Phymep, Paris) at a frequency of 0.033Hz (square pulse, duration 100µs) was performed. An input/output curve was established for each slice with stimulus intensity increasing by 20µA steps until the maximal response amplitude was obtained. Test intensity used for plasticity recording was set to 50-60% of the maximal response. LTD in adolescent animals was induced with a train made of 2 electric pulses separated by 200ms and delivered 900 times at 1Hz (pLFS 200-900). A train of 900 single pulse delivered at 1Hz (LFS 900) was used in pre-pubertal animals (Kemp et al., 2000). Population spike amplitude was used to quantify the plasticity response. For field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) analysis, the recording electrode was placed into the *stratum radiatum*. NMDA-fEPSPs were isolated with an aCSF containing zero-Mg^{2+} in which 50µM bicuculline, a GABA-A receptor antagonist, and 10µM 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX), an AMPA/kainate receptor antagonist, were added. At the end of fEPSPs recording, 20µM DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), an NMDA receptor antagonist, was applied.

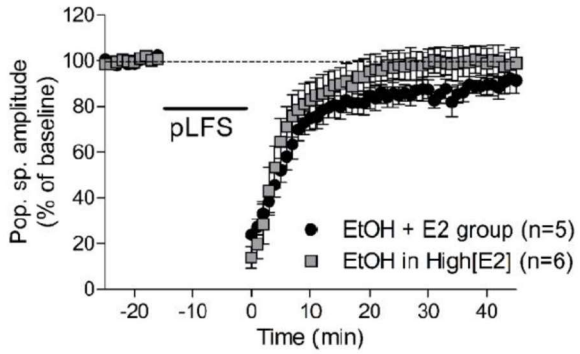
Response was quantified on EPSP's slope measured just after the afferent volley. All results are expressed as percent change relative to baseline value. The role of GluN2B subunit was assessed using 5µM Ro 25-6981, a selective antagonist of GluN2B subunit (Fischer et al., 1997). Signals were amplified (Grass amplifier, x1000-2000), filtered (1-3kHz), and acquired on computer with Signal software (CED, Cambridge, UK) for off-line analysis. Only slices demonstrating 20 minutes of stable baseline recording were used (only 10 minutes are shown in figures), and measurements were averaged every minute. Recordings were performed 24 hours after the treatment. In all cases, "N = " is the number of animal used and "n = " is the number of slice tested.

Statistics and Data Presentation

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis of LTD was made on raw data with One-Way ANOVA or Two-Way ANOVA followed by post-hoc Tukey test when necessary. For group comparison, a Student's t-test was used. In all test, we chose $P < 0.05$ as significant. In figures of electrophysiology, traces on top are averaged per minute (n = 3 sweeps) and superimposed individual signals taken before and after plasticity induction in different experimental conditions. Time calibration was 100 ms and voltage calibration was 0.2 mV for all somatic recording figures. Regarding dendritic recordings, time calibration was 10 ms for time and 0.05 mV for amplitude. Effect size was calculated as it follows: [Mean of experimental group]-[Mean of control group] / Standard deviation polled from both group (NaCl in $Low_{[E2]}$ as our control group).



Suppl. Figure 1. **(A)** in post-pubertal females, abolition of LTD occurred only when both ethanol and E2 peaked at the same time point, i.e. when ethanol was injected in High$_{[E2]}$ phase (EtOH in High$_{[E2]}$ group)and recording performed 24 h later. **(B)** 24 h after 2 ethanol injections in Low$_{[E2]}$ phase, there was no differences on LTD magnitude when recording was performed either in High$_{[E2]}$ or Low$_{[E2]}$ phases: EtOH in Low$_{[E2]}$; Rec in High$_{[E2]}$: 54.6 ± 4.4% vs EtOH in Low$_{[E2]}$: 52.2 ± 4.5 %, P > 0.05 between groups. **(C1)** E2 alone slightly but significantly decreased LTD 24 h after injection in post-pubertal females (-16%, see text for details). **(C2)** Ethanol alone did not alter LTD magnitude in these animals. **(D1)** In pre-pubertal females, E2 had no effect on LTD. **(D2)** The same was true for ethanol alone in these animals. **P<0.01, ***P < 0.001, ns stands for nonsignificant**.**



Suppl. Figure 2. Comparison of the effects of ethanol on LTD with endogenous or exogenous E2. LTD was abolished as long as EtOH and E2 were highly present at the same time, either endogenously (EtOH in High[E2] group) or exogenously (EtOH + E2 group).

Chapitre 4 : Discussion et Perspectives

Différence mâles/femelles sur l'altération de la plasticité hippocampique induite par le *binge drinking*

1. Considérations techniques

Pour notre étude nous avons utilisé un modèle d'alcoolisation ponctuelle importante que nous avons mis en place au laboratoire. Ce modèle consiste en 2 administrations d'éthanol 20% à une dose de 3g/kg (v /v) par injection intrapéritonéale espacées de 9 heures chez des rats dans le but d'enregistrer, après une période sans éthanol, la plasticité au niveau de l'hippocampe. Pour rappel, dans notre précédent article nous avions mis en évidence que 2 injections d'éthanol étaient nécessaires et suffisantes pour enregistrer des effets négatifs sur la plasticité 48 heures après la première injection chez des rats mâles adolescents âgés de 35 à 45 jours (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). Notre modèle prend en compte deux facteurs importants. D'une part, la vitesse de métabolisation de l'éthanol, et d'autre part, la fréquence ou plus précisément la nécessité de répéter les épisodes de consommation importante. La vitesse de métabolisation de l'éthanol est plus rapide chez le rat. Elle atteint 300mg/kg/h contre 100-150mg/kg/h chez l'Homme (Pastino *et al.*, 1997). Lorsque l'on compare ces chiffres aux éthanolémies obtenues chez nos animaux (environ 300mg/dL) il faut environ 9 à 10h pour que les rats, mâles et femelles, éliminent l'éthanol, ce que nous retrouvons effectivement dans nos cinétiques d'éthanolémies. Extrapolé à l'Homme, il faudrait entre 20 et 25h pour éliminer cette même quantité d'éthanol. Ainsi, les deux injections que l'on administre aux rats à 9h d'intervalle, représenteraient, chez l'Homme, de manière approximative, deux épisodes de *binge drinking* espacés d'environ 24h. Ce choix est important car il est en accord avec la fréquence de consommation que l'on peut retrouver chez de jeunes étudiants (Crego *et al.*, 2010). Pour rappel, le *binge drinking* est défini par la NIAAA comme une alcoolisation qui aboutit à une alcoolémie de 0.08% ou plus en une période de temps de 2 heures. Notre modèle respecte cette définition puisqu'il permet d'étudier les effets sur la plasticité de seulement deux doses aigües et massives d'éthanol dépassant cette alcoolémie seuil, espacées de 9 heures qui permettent de retrouver une éthanolémie nulle. À l'aide de ce modèle, nous pouvons mettre en évidence les effets précoces que ce type d'alcoolisation peut

avoir sur la plasticité, là où les modèles classiques d'exposition de type *binge drinking*, reposant sur un protocole de *poly-binges* basé sur l'alternance entre forte consommation/administration d'éthanol et sevrage pendant plusieurs semaines, étudient les conséquences à moyen et long termes de ce type de consommation (Fernandes *et al.*, 2018; Tapia-Rojas *et al.*, 2018).

Pour répondre à nos questions scientifiques nous avons fait le choix de travailler avec des rattes adolescentes. Cependant, la puberté chez la femelle commence plus précocement que chez le rat mâle (Figure 24 ; (Schneider, 2013)), et avec elle, la mise en place du cycle œstral et la nécessité de le prendre en considération.

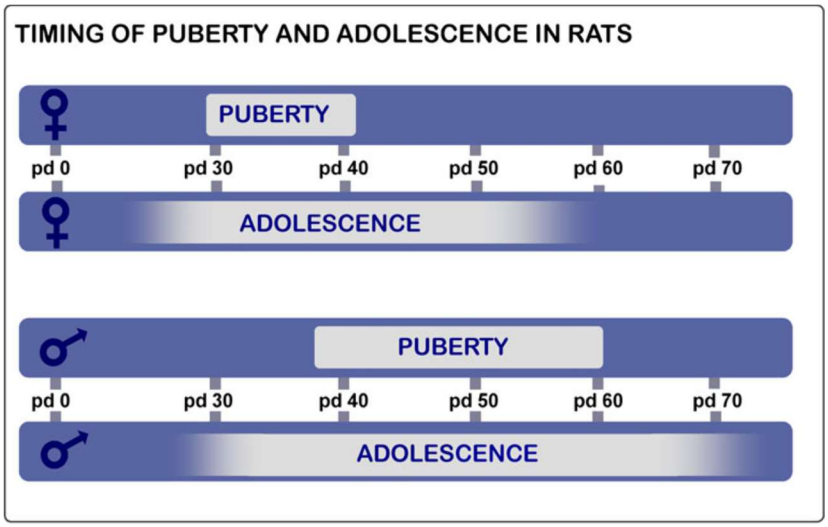


Figure 24: Apparition de la puberté chez le rat en fonction du sexe.

(Schneider, 2013)

L'estradiol ayant un impact sur la plasticité (voir partie « Œstrogènes et plasticité » page 112), nous avons mis en place une procédure de frottis vaginaux réguliers nous permettant de connaître les phases du cycle œstral chez nos femelles. Ainsi nous avons été en mesure d'injecter l'éthanol pendant des phases précises nous permettant de nous abroger de cette contrainte. Cependant, une autre méthode permettant d'éviter l'implication du cycle physiologique est de pratiquer une ovariectomie sur les femelles. Ainsi privé de la principale source hormonale endogène, il est possible de contrôler le pic d'estradiol via des injections sous-cutanés ou la pose d'une capsule œstrogénique libérant de l'estradiol en continu chez

les animaux (Sophocleous and Idris, 2019). Toutefois, nous avons considédéré que cette méthode ne convenait pas à notre protocole expérimental parce qu'elle nécessite un geste chirurgical engendrant du stress pour les animaux. Or le stress, a des répercussions sur la plasticité synaptique. Il est notamment responsable d'une diminution de la PLT et d'une augmentation de la DLT (pour revue voir (Kim, Pellman and Kim, 2015)) avec également des effets différentiels en fonction du sexe (pour revue voir (McEwen, Nasca and Gray, 2016)) . Cependant, la plupart des études s'intéressent à un stress chronique et ses répercussions sur le cerveau et il est possible que le stress engendré par une ovariectomie ne soit pas suffisant pour induire des altérations de la plasticité. De plus, l'utilisation d'animaux intacts permet de les conserver dans une intégrité physiologique totale mais, nous obligeait à prendre en considération les phases du cycle œstral. Enfin, ne pas pratiquer d'ovariectomie nous permet de rester dans une maturation cérébrale physiologique puisque les œstrogènes participent à la maturation de différentes structures cérébrales pendant la puberté (Goddings *et al.*, 2019). Ainsi, pour éviter tout biais expérimental ou le recours à la chirurgie, nous avons choisi la technique du frotti vaginal telle que décris dans le chapitre 2 (3. Détermination du cycle ovarien, page 139). La lecture du frotti est faite sur état frais, ne permettant pas de préserver le frotti après la lecture. Cette technique a comme principal intérêt d'être rapide ce qui représentait un avantage dans notre cas d'étude puisque le dépistage était nécessaire avant l'injection d'éthanol pour connaître l'état du cycle avant l'administration. De fait, il nous était impossible d'utiliser une technique de dépistage nécessitant des temps d'attente comme une coloration par exemple.

2. *Binge*, œstrogènes et plasticité

2.1 Effet de l'éthanol en fonction de la phase du cycle œstral

Nous avons d'abord vérifié l'implication du cycle œstral sur la plasticité de l'hippocampe en sacrifiant l'animal pendant la phase de prœstrus, lorsque les taux d'œstrogènes circulant sont les plus élevés, ou pendant les autres phases du cycle, présentant des taux endogènes faibles en œstrogènes. Nous n'avons pas mis en évidence de différences dans l'amplitude de la plasticité de type DLT en fonction des concentration endogènes œstrogènes. Ensuite, nous avons injecté l'éthanol pendant la phase de prœstrus, ou pendant la phase d'œstrus,

permettant d'observer les effets de l'éthanol en fonction du taux d'œstrogènes circulant. Ainsi, nous avons mis en évidence que lorsque l'éthanol est présent en même temps que le pic d'œstrogènes endogènes, nous obtenions une abolition de la DLT 24h après la première injection d'éthanol. Ce résultat est différent de celui observé chez le rat mâle d'âge équivalent chez qui l'abolition de la DLT n'apparaît que 48h après la première injection de la même dose d'éthanol (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). Cette abolition de la DLT suivant l'injection d'éthanol spécifiquement pendant le prœstrus suggère que la sensibilité des femelles vis-à-vis de ce modèle de *binge drinking* serait due à la présence concomitante d'éthanol et d'œstrogènes. Il a été montré que le cycle œstral, *in vivo*, à des répercussions sur la plasticité synaptique. Le cycle serait notamment responsable d'une augmentation de la PLT et d'une diminution de l'induction de la DLT (Warren *et al.*, 1995; Good, Day and Muir, 1999) pendant la phase de prœstrus. Nous pouvons souligner que l'estradiol reste important pour le bon fonctionnement de la plasticité, plus particulièrement pour la DLT, puisque l'ovariectomie provoque une abolition de la DLT, sans répercussions sur la PLT chez des rattes. De plus, l'apport exogène d'estradiol chez ces femelles ovariectomisées permet de récupérer une DLT similaire aux animaux non ovariectomisés (Day and Good, 2005). Les différences observées avec nos résultats, concernant l'implication du cycle sur la DLT, peuvent venir tout d'abord du modèle expérimental et de la différence *in vivo* / *ex vivo*. Dans la littérature, on retrouve sur des tranches d'hippocampe de femelles ovariectomisées que l'apport d'estradiol permet d'améliorer la DLT et de faciliter son seuil de déclenchement (Desmond, Zhang and Levy, 2000; Reza Zamani, Desmond and Levy, 2000) suggérant l'importance de l'estradiol dans les mécanismes de la DLT. Toutefois, la plupart des études utilisent des animaux adultes, sans prendre en compte la différence de maturation de l'hippocampe que l'on peut retrouver entre des adultes et des adolescents pouvant expliquer cette différence de réponse (Fuhrmann, Knoll and Blakemore, 2015). Il a par exemple été mis en évidence qu'en fonction de l'âge, l'estradiol avait des effets différents sur la plasticité de l'hippocampe. En comparant des femelles jeunes adultes (3 à 4 mois) et des femelles âgées (23 à 24 mois) ovariectomisées, il a été montré que l'apport d'estradiol exogène permettait d'augmenter la densité des synapses au niveau de l'hippocampe sans répercussions sur la distribution des récepteurs NMDA chez les jeunes adultes. Au contraire, l'apport d'estradiol n'a pas d'effet sur la densité des synapses mais permet d'augmenter la présence de récepteurs NMDA au niveau synaptique chez les femelles âgées (Adams *et al.*, 2001). Ces résultats montrent que l'hippocampe des femelles

répond différemment en fonction de l'âge avec une incapacité des femelle âgées de former de nouvelles synapses mais compensant par une présence plus importante de récepteurs NMDA au niveau de la synapse. Dans notre étude, ce recrutement de nouvelles synapses pourraient être l'une des causes permettant une altération de la plasticité lorsque l'éthanol est présent. De plus, il a déjà été mis en évidence un impact plus important de l'éthanol chez des animaux immatures (30 jours) comparativement à des adultes (65 jours) dans des tests de mémoire de travail spatial (Markwiese *et al.*, 1998).

Enfin, nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans des études comportementales récentes dans lesquelles les femelles présentaient plus d'atteintes cognitives que des mâles dans des tests impliquant l'hippocampe lors d'une présence concomitante d'éthanol et d'estradiol (Sircar, 2019). On peut supposer que nos résultats chez les femelles pourraient se transcrire par des atteintes comportementales, comme nous l'avions montré chez les mâles adolescents. En clinique, il existe également des différences homme/femme dans les effets du *binge drinking* chez les adolescents et les jeunes adultes. (Squeglia *et al.*, 2012; Kvamme *et al.*, 2016).

Nos résultats, à la lumière de la littérature, suggèrent une interaction entre éthanol et œstrogènes dans les atteintes de plasticité hippocampique qui pourrait se tradurie par des modifications du comportement suite à l'abolition de la DLT. Toutefois, afin de confirmer cette possible interaction, nous avons répliqué cette abolition de la DLT à 24h en présence d'éthanol et d'estradiol dans d'autres modèles expérimentaux, mâles comme femelles.

2.2 Effet de l'injection exogène d'estradiol chez les femelles pubères, prépubères et les mâles pubères

Pour confirmer notre hypothèse selon laquelle la présence concomitante d'éthanol et d'estradiol serait responsable de ce décalage de temporalité observé dans l'atteinte de la DLT entre les mâles et les femelles adolescentes, nous avons réitéré notre protocole expérimental chez des femelles pubères en injectant l'éthanol ainsi que l'estradiol pendant une phase du cycle œstral pauvre en œstrogènes. Dans ce cadre, nous avons retrouvé l'abolition de la DLT seulement lorsque l'on injecte l'éthanol et l'estradiol, l'un à la suite de l'autre, dans un temps

très court, appuyant l'hypothèse d'une interaction entre les deux molécules responsable de cette abolition.

Pour conforter notre résultat, nous avons effectué de nouveau ce même protocole chez des femelles prépubères, ne présentant pas de cycle œstral, ainsi que chez des mâles adolescents, chez qui la production d'estradiol endogène physiologique est très faible. Dans ces deux cas nous avons trouvé des résultats similaires où seul la co-injection éthanol et estradiol permettait d'abolir la DLT après 24h. Toutefois, l'on peut noter chez les femelles pubères que l'injection d'estradiol exogène seule diminue faiblement mais significativement l'amplitude de la DLT. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'estradiol exogène associé au taux circulant d'estradiol peut être plus élevé que la concentration du pic naturel d'estradiol aboutissant à un effet sur la plasticité proche de celui qu'on observe dans la littérature chez des femelles adultes (Good, Day and Muir, 1999). Ces résultats suggèrent que l'interaction éthanol/estradiol ne dépend pas d'une maturation de l'hippocampe lié à l'adolescence, ni même d'une différence de sensibilité d'une structure liée au sexe. Des atteintes similaires sont observées chez les femelles ovariectomisées et chez les mâles exposés à de l'estradiol dans des tests de peur contextuelle conditionnée (Sircar, 2019). Dans cette étude, il a été montré que les animaux exposés à l'estradiol, mâles comme femelles, avaient des comportements similaires à des femelles en prœstrus suite à l'injection d'éthanol. Ce résultat suggère que l'interaction éthanol/estradiol a des répercussions comportementales dans un test impliquant l'hippocampe, et ce, chez des femelles mais également chez des mâles.

2.3 Œstrogènes et *Binge drinking* chez la femelle adulte, différence de sensibilité mâle/femelle

Afin d'étudier la sensibilité des femelles adolescentes par rapport à des femelles adultes, nous avons mesuré l'impact de notre protocole de *binge drinking* et du cycle œstral chez des femelles adultes. Nous n'avons enregistré aucun effet du cycle endogène, de l'éthanol, ou du délai après les injections chez ces animaux adultes. Ces résultats peuvent suggérer une plus grande sensibilité des adolescentes aux effets de l'éthanol comme on le retrouve dans la littérature (Markwiese *et al.*, 1998; Sircar and Sircar, 2005; Sircar, Basak and

Sircar, 2009). Cependant, en fonction des structures et des fonctions interrogées, ce point ne fait pas l'unanimité puisque des résultats contradictoires ont été démontré chez des rats où les adolescents étaient plus résistants que les adultes dans des tâches locomotrices (White *et al.*, 2002) ou encore qu'aucune différence n'était observé dans des taches de peur contextuelle entre adolescents et adultes (Broadwater and Spear, 2014). Ainsi, les adolescents présentent une plus grande sensibilité à certains des effets de l'éthanol, pouvant expliquer la grande disparité des résultats présentés sur le sujet (Spear, 2000).

Il est également possible d'expliquer ce résultat par la notion de « valence » hormonale. Au début de la puberté, il est possible que le système nerveux central ne soit pas encore « habitué », ou suffisament imprégné, de la charge hormonale circulant dans les structures cérébrales. Ce temps d'imprégnation encore insuffisant à la puberté, du fait du l'émergeance récente des cycles ovariens, rendrait le cerveau plus sensible aux effets de l'estradiol. En effet, au moment où nos animaux sont sacrifiés, les femelles ont expérimentés 3 à 4 cycles ovariens au maximum, ce qui représenterait un temps d'imprégnation trop faible par rapport aux adultes, et qui pourrait donc expliquer les résultats observés. Il a déjà été mis en évidence que les hormones sexuelles ont des rôles dans l'organisation des structures cérébrales commençant dès la puberté (Piekarski, Boivin and Wilbrecht, 2017). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence l'implication des œstrogènes et de la progestérone dans la maturation cérébrale à l'adolescence mais également la mise en place précoce de caractère « adulte » chez des animaux prépubères exposés aux hormones sexuelles. En s'appuyant sur ces résultats on peut émettre l'hypothèse qu'au début de la puberté, les changements dans l'organisation des structures cérébrales déclenchées par la sécrétion d'hormones sexuelles vont augmenter la sensibilité des femelles aux œstrogènes. Si l'on applique cette hypothèse à notre étude, il est possible que les femelles pubères présentent une plus grande sensibilité aux œstrogènes que les rattes adultes, aboutissant sur un état d'excitation plus important des neurones chez les rattes pubères permettant d'observer une abolition de la DLT dès 24h lors de l'injection d'éthanol. Cependant, il est important de noter que l'espèce et la structure étudiées ainsi que les protocoles expérimentaux de cette étude sont différents des notres.

Enfin, il aurait été intéressant d'effectuer nos expériences chez des rats mâles adultes en injectant l'éthanol en même temps que de l'estradiol. Dans ce contexte et si la notion de « valence » hormonale est plausible, on pourrait s'attendre à voir des mâles adultes plus

sensibles aux effets des œstrogènes que les femelles adultes, avec potentiellement une diminution ou une abolition de la DLT chez les mâles. Toutefois il ne faut pas oublier que les mâles sont capables de synthétiser des œstrogènes en petite quantité (pour revue voir (Barakat *et al.*, 2016)) et il est donc possible également qu'à l'âge adulte, les mâles ne réagissent pas plus fortement que les femelles à cause de cette imprégnation hormonale naturelle qui s'est développé au contact de la petite quantité d'œstrogènes présent chez les mâles.

Nous avons également étudié la différence de sensibilité des femelles adolescentes par rapport aux mâles en essayant de reproduire une abolition de la DLT dès 24h chez les mâles, sans injection d'estradiol. Étant donné que dans notre étude précédente (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016) une abolition de la DLT chez les mâles n'avait été observée que 48h après deux *binges* à 3g/kg, nous avons émis l'hypothèse qu'une dose supérieure pourrait accélérer l'abotion de la DLT. Ainsi, nous avons augmenté la dose d'éthanol à 3,75g/kg (v/v), injectée 2 fois à 9h d'intervalle, et nous avons relevé une éthanolémie similaire à celle observée chez les femelles injectées à 3g/kg (Figure 25). Sur les enregistrements de la plasticité, nous avons mesuré une abolition de la DLT à 24h, similaire à celle obtenue chez les femelles lorsque l'on injecte l'éthanol pendant la phase de prœstrus. Ce résultat suggère donc qu'il n'y a pas de différence de sensibilité à l'éthanol entre les mâles et les femelles puisqu'ils présentent tous deux une abolition de la DLT à des éthanolémies similaires. Cependant, les mâles, comme les femelles, présentent également une abolition de la DLT lorsque l'éthanol est injecté en même temps que la forte présence d'estradiol (endogène ou exogène). Ce dernier résultat suggère la potentielle implication d'un mécanisme similaire entre les deux sexes. Enfin, les femelles ne présentent pas d'abolition de la DLT 24h après l'injection d'éthanol si cette dernière n'est pas administrée pendant un pic d'estradiol.

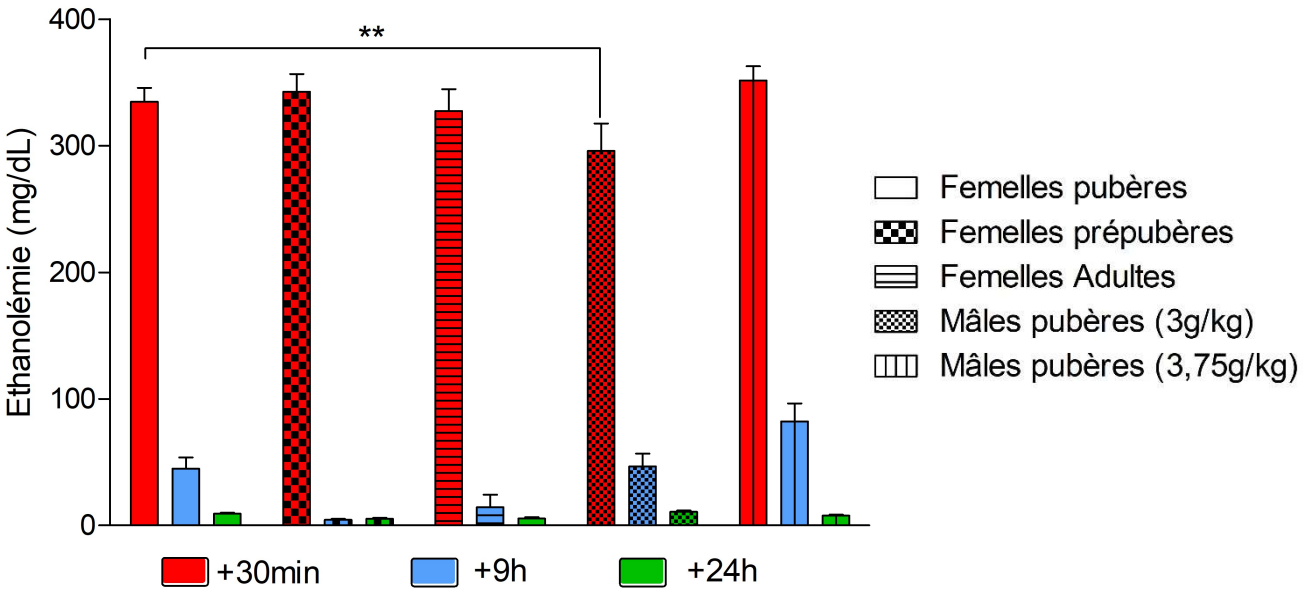


Figure 25: Représentation graphique des éthanolémies de rats mâles et femelles en fonction de l'âge et de la dose injectée.

Les femelles pubères, prépubères et adultes recevant une injection d'éthanol à 3g/kg (v/v, i.p.) présentent une éthanolémie similaire 30 minutes après l'injection. Les mâles pubères, présentent une éthanolémie significativement plus faible que les femelles pubères lorsqu'ils reçoivent une injection d'éthanol à 3g/kg. Cependant, une injection plus importante d'éthanol (3,75g/kg) permet d'obtenir chez le mâle une éthanolémie similaire à celle des femelles.

Réalisé par Rabiant K.

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que la femelle adolescente n'est pas plus sensible que le mâle du même âge aux effets de l'éthanol sur la plasticité de l'hippocampe, et que sa vulnérabilité apparente serait causée par la présence importante d'estradiol dans son organisme à un moment précis de son cycle ovarien. La différence d'éthanolémie est intéressante car retrouvée en clinique où les femmes présentent des éthanolémies plus importantes que les hommes à consommation équivalentes (Frezza *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1996) et ce malgré une métabolisation de l'alcool plus importante (Thomasson, 2000).

2.4 Mécanismes d'action de l'œstrogène

Pour étudier l'implication des récepteurs à l'estradiol, nous avons utilisé le tamoxifène, un antagoniste non spécifique des ERs connu comme étant un SERM (Selective Estrogen Modulator). Il s'agit d'une molécule synthétique non stéroïdienne qui agit sur les récepteurs

aux œstrogènes, pouvant agir à la fois comme un agoniste ou un antagoniste en fonction des tissus ciblés (Riggs and Hartmann, 2003). Nous avons utilisé une dose de 10mg/kg, injecté par voie intrapéritonéale, n'ayant aucun effet sur les capacités cognitives tout en préservant ses propriétés antagonistes des ERs (Lichtenfels *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que le tamoxifène seul n'a pas d'effet sur la DLT. Cependant, il est capable de prévenir l'abolition de la DLT à 24h lorsqu'il injecté en même temps que l'éthanol et l'estradiol. Cependant cet effet de prévention n'est pas visible au délai de 48h. Il est possible que l'estradiol augmente l'excitabilité des neurones de l'hippocampe en agissant sur les ERs, les plaçant dans un état excité tel que présenté dans la théorie du « Two-Step wiring plasticity » ((Srivastava, 2012), voir page 121 du présent manuscrit). Les neurones seraient alors plus sensibles aux effets de l'éthanol ce qui provoquerait l'abolition de la DLT visible chez les mâles comme chez les femelles 24h après le traitement. Toutefois, sans la présence d'estradiol, l'abolition de la DLT chez les femelles apparait 48h après le traitement comme ce que nous avons observé chez les mâles (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016) suggérant également que l'effet des œstrogènes permet de renforcer un effet provoqué par l'éthanol au délais de 24h, alors qu'au délai de 48h, seul l'éthanol serait responsable de l'abolition de la DLT puisque le tamoxifène ne prévient pas cet effet.

Néanmoins notre protocole expérimental ne nous permet pas d'identifier le mode d'action précis de l'estradiol. Bien que ces effets passent par l'activation des ERs, nous ne sommes pas en mesure de distinguer l'implication des ERα versus les ERβ. La littérature diverge sur l'implication majoritaire de ces récepteurs. Au niveau de l'hippocampe, les deux récepteurs sont présents bien que ERβ soit majoritaire (voir partie « Les œstrogènes » 2.4 répartitions et fonction des récepteurs, page 113). Les deux récepteurs peuvent avoir des implications dans les processus de plasticité. Il a été mis en évidence que des agonistes spécifiques de ces deux récepteurs peuvent améliorer différents types de performances cognitives (Phan *et al.*, 2011; Gabor *et al.*, 2015) bien que des études montrent que l'ERα a plus d'influence sur la DLT que l'ERβ (Mukai *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2015). Cependant, il a été montré que l'estradiol sur culture cellulaire provoque rapidement (en 5 minutes) une translocation des récepteurs ERβ vers la surface de la membrane, augmentant ainsi sa biodisponibilité (Sheldahl *et al.*, 2008). Cet argument est en faveur de l'implication majoritaire des ERβ dans les effets observés. Pour appuyer cette hypothèse, on peut citer l'équipe de Liu qui a montré l'importance de ERβ dans la plasticité synaptique mais également dans des

tâches de mémorisation chez le rat et la souris. Dans cette étude, ils ont montré que le WAY 200070, un agoniste spécifique ERβ, augmentait *in vivo* la protéine synaptique PSD 95, mais également la synaptophysine et la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA. De plus, ils ont montré que cet agoniste permettait d'améliorer les performances des animaux dans des tâches de mémoire, tel que le labyrinthe en Y, le labyrinthe radial ou l'Atlantis water maze (un dérivé du MWM), nécessitant l'hippocampe. Enfin, ils ont mis en évidence que l'activation de ERβ permettait d'augmenter la densité et la taille des épines dendritiques en augmentant les épines en forme de champignon au niveau de l'hippocampe. Concernant la plasticité, ils ont montré également que l'ERβ contribuait à augmenter la PLT (Liu *et al.*, 2008). Toutefois son rôle sur la DLT n'a pas été étudié dans cet article.

Pris dans leur ensemble, ces résultats, bien que contradictoires, montrent que les ERs sont impliqués dans la plasticité. Dans notre étude, il faudrait utiliser des agonistes plus spécifiques pour mettre en évidence un mécanisme d'action plus précis de l'estradiol dans les effets observés. Il nous faudrait utiliser des antagonistes plus spécifiques des ERs comme le 1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride (MPP) pour les ERα et le 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo [1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol (PTHPP) pour les ERβ.

Il est également possible, puisque le tamoxifène est injecté en intrapéritonéale, que son effet antagoniste affecte d'autres structures cérébrales liées à l'hippocampe et qui pourraient être responsable des effets observés chez les femelles *bingées*. Si l'on s'intéresse aux structures afférentes à l'hippocampe, on retrouve le cortex entorhinal qui possède un grand nombre de neurones sensibles à l'estradiol, sujet à l'effet de blocage du tamoxifène (Loy, Gerlach and McEwen, 1988). Pour rappel, le cortex entorhinal (CE) est le carrefour de l'information projetant ses efférences sur l'hippocampe. Avec l'hippocampe et les cortex périrhinal et parahippocampique, ils forment le lobe temporal médian. Dans la littérature, le cortex enthorinal est connu pour posséder des cellules dites « spatiales » permettant le positionnement dans l'espace, étroitement connecté avec l'hippocampe. Cette découverte a rapporté le Prix Nobel de Physiologie en 2014 à O'Keefe, Moser et Moser (O'Keefe, Dostrovsky and J. O'Keefe, 1971). Le rôle du cortex enthorinal dans la mémoire est mis en avant en clinique, notamment dans des études sur la maladie d'Alzheimer (AD), où il serait parmi les premières structures touchées, mais également dans les cas de perturbations cognitives

légères (*mild cognitive impairment* : MCI) (Pihlajamaki, Jauhiainen and Soininen, 2009; Khan *et al.*, 2014). Son volume est corrélé avec des performances de mémorisation chez des participants sains, mais également chez des patients atteints de AD et de MCI (Di Paola *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2011; Fujishima *et al.*, 2014). L'utilisation de l'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRMf) montre une activation du CE dans des tâches de mémorisation (Newmark *et al.*, 2013; Maass *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que la stimulation cérébrale profonde du CE chez des patients épileptiques permet d'améliorer l'apprentissage spatial là où une stimulation directe de l'hippocampe n'a pas d'effet (Suthana *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent une forte interaction du CE et de l'hippocampe dans des tâches de mémorisation et cette interaction pourrait être impliquée dans les effets observés sur la plasticité de l'hippcampe dans notre étude. Concernant les autres structures projetant sur l'hippocampe, le tronc cérébral (TC) dispose d'ERs chez la ratte et le mouton (Simonian and Herbison, 1997; Scott *et al.*, 1998) avec une fluctuation de ces ERs, principalement ERα, pendant le cycle de l'œstrus chez le rat (Haywood *et al.*, 1999). De plus, le tronc cérébral est associé à l'hippocampe dans des tâches mnésiques. Il a récemment été montré en utilisant l'optogénétique, que les cellules GABAergiques du *nucleus incertus*, caractérisées par l'expression du neuropeptide relaxin-3 régulant le stress, l'éveil, les comportements alimentaires et la mémoire, inhibent les interneurones de l'hippocampe (Szőnyi *et al.*, 2019). Il est donc possible que l'interaction entre ces deux structures soit impliquée dans les résultats que nous obtenons dans notre étude. En effet, si l'estradiol, par les biais de ses récepteurs se trouvant sur le TC, peut induire une inhibition des interneurones GABAergique de l'hippocampe, il pourrait participer, par cette voie, à placer l'hippocampe dans un état excitable, favorisant l'abolition de la DLT observée dans notre étude. De plus, un autre type d'expérience serait nécessaire pour permettre de discriminer les effets provenant de l'hippocampe seul et non d'un effet produit par une structure connectée. La première expérience impliquerait une injection intracérébrale de tamoxifène ou des antagonistes souhaités directement dans l'hippocampe. En utilisant cette technique, nous devrions être en mesure d'enregistrer la plasticité synaptique de l'hippocampe d'animaux à qui l'on a administré à la fois de l'éthanol, de l'estradiol et une injection intrahippocampique de tamoxifène ou autres antagonistes. Ainsi nous pourrions mesurer l'implication des ERs de l'hippocampe dans les mécanismes observés. Une autre méthode consisterait à utiliser une souche d'animaux *knock-out* aux ERs (α, β ou les deux) qui nous permettrait de totalement

s'abroger de leurs effets. Cependant, cette approche nécessiterait une réévaluation complète de nos résultats car il s'agirait d'une nouvelle espèce (souris) avec un cycle de l'œstrus propre, une métabolisation de l'éthanol particulière, et d'autres caractéristiques inhérents à la souche utilisée (Couse and Korach, 1999; Pettersson and Gustafsson, 2001; Ascenzi, Bocedi and Marino, 2006).

2.5 Implication de la sous-unité GluN2B dans l'abolition de la DLT

L'analyse des PPSE-NMDA chez les femelles suggère qu'une altération du taux d'expression de la sous-unité GluN2B pourrait être à l'origine de l'abolition de la DLT observée 24h après le traitement. Nous avons enregistré une efficacité plus importante d'un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B, le Ro 25-6981, sur le PPSE-NMDA des femelles à qui nous avons administré de l'éthanol et de l'estradiol comparativement aux groupes éthanol seul, estradiol seul, ou témoin. Ces résultats concordent avec ceux que nous avions précédemment mis en évidence chez des mâles adolescents, chez qui nous avons enregistré une augmentation similaire de la réponse du PPSE à l'antagoniste GluN2B 48h après le traitement, au moment où la DLT est abolie. Cela suggère donc un mécanisme commun entre mâles et femelles dans l'effet de l'éthanol sur la plasticité, d'autant que dans les phases à faible taux d'œstrogènes, l'éthanol seul abolissait la DLT à 48h, comme chez les mâles. Cependant, l'abolition de la DLT intervient plus tôt chez les femelles lorsque les taux d'œstrogènes sont importants et il reste à mettre en évidence le mode de fonctionnement de cette interaction éthanol/estradiol. Il a été montré chez des rattes qu'un traitement à l'estradiol augmente le taux d'ARNm GluN2B (Adams *et al.*, 2004; Smith and McMahon, 2006) ainsi que le courant transmembranaire dû aux récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B au niveau de CA1. Cette augmentation de courant est associée à une augmentation de la biodisponibilité synaptique des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B 24h après l'injection d'estradiol (Smith *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'estradiol joue un rôle de modulateur de la sous-unité GluN2B, ce qui pourrait, dans notre expérience, expliquer pourquoi on retrouve une efficacité augmentée de l'antagoniste spécifique de cette sous-unité. Il reste également à mettre en évidence si l'effet des œstrogènes va recruter/induire la translocation des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B déjà existants, ou si l'estradiol va induire une augmentation de la production de ces récepteurs (Adams *et al.*, 2004). De plus, puisque les résultats chez le

mâle à 24h sont similaires à ceux enregistrés chez la femelle à 24h lorsque le mâle est traité avec l'éthanol et l'estradiol, nous pouvons mettre en avant une éventuelle potentialisation des effets de l'éthanol par l'estradiol. En effet, il est possible que, par le biais de l'activation des ERs, l'estradiol va augmenter l'effet de l'éthanol pour produire des effets sur la plasticité plus rapidement. On peut souligner qu'il a été mis en évidence par l'équipe de Shiroma que l'estradiol est capable de convertir une DLT induite chimiquement par le NMDA en PLT chez le rat mâle (Shiroma, Yamaguchi and Kometani, 2005) ce qui pourrait renforcer cette idée d'une augmentation des effets d'une stimulation, ici chimique, pour modifier la directionnalité de la plasticité. L'équipe de Vedder a également mis en évidence chez des femelles ovariectomisées une augmentation de la PLT en lien avec la sous-unité GluN2B ainsi qu'une augmentation des performances des animaux lors d'un test NOR (Vedder *et al.*, 2013). On retrouve ici un rôle similaire de la sous-unité GluN2B à celui que nous avions obtenus dans notre précédente étude (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016). De manière intéressante, nous pouvons suggérer que nos résultats sont en accord avec l'hypothèse du « Two-Step wiring plasticity ». Il est possible dans nos expériences que l'estradiol contribue à placer les cellules dans un état d'excitabilité leur permettant de répondre plus fortement à une stimulation (Srivastava, 2012). On retrouve une notion similaire à celle abordée par Bienenstock, Cooper et Munro sur la théorie BCM (Bienenstock, Cooper and Munro, 1982). Dans cette théorie, les auteurs expliquent qu'il existe un seuil d'intensité de stimulation qui définit le déclenchement d'un type de plasticité. Lorsque ce seuil est dépassé, une PLT sera induite, en dessous de ce seuil, une DLT sera induite. Ce seuil peut également être modifié, à la hausse comme à la baisse, et cette théorie fut plus tard reprise et adapté à l'hippocampe (Dudek and Bear, 1992; Stanton, 1996). C'est ce qu'on appelle la métaplasticité. Dans une revue de 2013, l'équipe de Paoletti rappelle que le ratio GluN2A/GluN2B au niveau de la synapse peut modifier le seuil d'induction de la plasticité. Ainsi, selon eux, tout décalage de ce ratio vers la gauche, en faveur d'une augmentation de la sous-unité GluN2B, entraine une facilitation de la PLT et donc une induction plus compliquée de la DLT (Figure 26) (Paoletti, Bellone and Zhou, 2013). Il est ainsi possible dans notre étude que l'estradiol participe au dérèglement de ce ratio GluN2A/GluN2B, tout comme l'éthanol, en faveur d'une augmentation du nombre de sous-unité GluN2B. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'on observe une abolition de la DLT dès 24h chez les femelles et les mâles lorsque l'éthanol est injecté en même temps que l'estradiol,

tandis que l'abolition à 48h, comme nous l'avons obtenu dans notre précédent article, persiste dans les tous les cas.

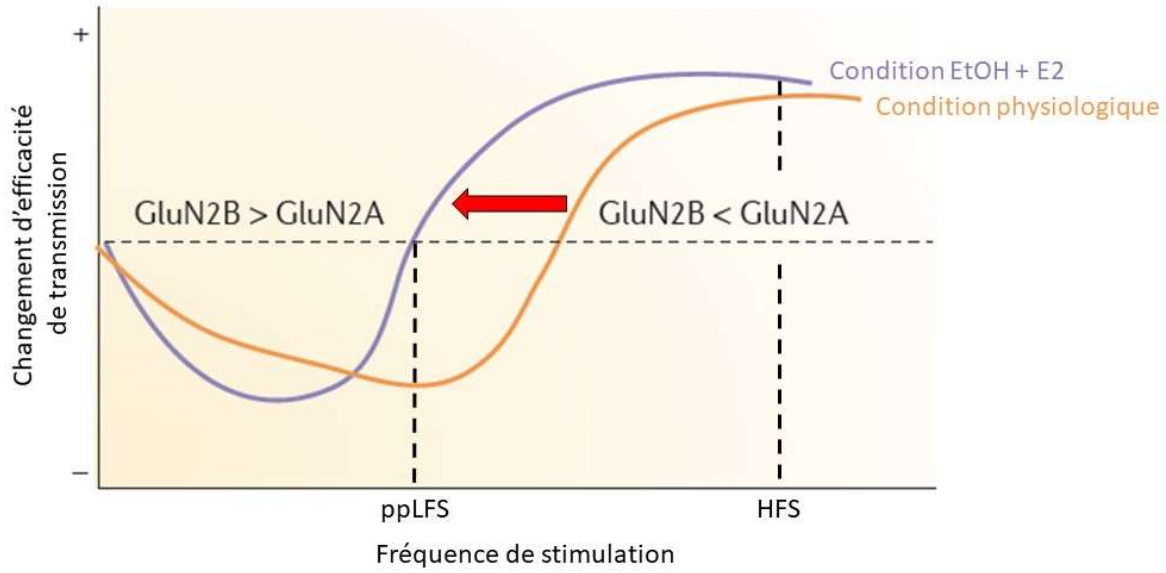


Figure 26: Représentation de la théorie BCM représentant les changements de métaplasticité de l'hippocampe pouvant être induite par l'injection d'éthanol et d'estradiol.

issu de (Paoletti, Bellone and Zhou, 2013)*; adapté par Rabiant K.*

Nos résultats suggèrent que l'estradiol agit sur la plasticité en modifiant l'état d'excitabilité des neurones dans l'hippocampe ce qui toutefois reste à vérifier. Si cette hypothèse se confirme, l'estradiol permettrait à l'éthanol d'avoir des effets plus importants sur la plasticité hippocampique. L'implication de la sous-unité GluN2B que nous retrouvions chez les mâles est également mis en cause chez les femelles et serait, une fois de plus, un argument en faveur d'une égalité des genres face à l'éthanol. Ainsi, les effets observés sur la plasticité ne seraient pas causés par une différence de sexe mais par la présence, ou non, d'une grande quantité d'estradiol dans l'organisme, chez les femelles comme chez les mâles.

3. Perspectives

3.1 Progestérone et mémoire

Notre étude s'est intéressée strictement à l'impact que les œstrogènes pouvaient avoir sur la plasticité de l'hippocampe et sa relation avec l'éthanol. Cependant, parmi les hormones sexuelles féminines ayant un effet sur la cognition, on retrouve la progestérone. Il s'agit, tout comme l'estradiol, d'une hormone stéroïdienne issue du cholestérol. C'est une hormone essentielle dans les fonctions reproductrices des femmes avec un pic qui apparait après l'ovulation (vers J15) pendant la phase lutéale. Elle remplit plusieurs fonctions dans le corps, notamment sur le cerveau où la progestérone va induire un relargage ou la synthèse de plusieurs molécules neuropotentes telles que le GABA, la norépinéphrine ou la POMC (proopiomélanocortine) (Graham and Clarke, 1997). Ses récepteurs sont également présent sous 2 isoformes A et B (Schrader *et al.*, 1972). Là encore les récepteurs se trouvent dans plusieurs tissus, notamment le cerveau (Graham and Clarke, 1997) et leur activation est lié à celle des ERs suggérant une interaction encore ces deux hormones (Lydon *et al.*, 1995). L'effet de la progestérone peut être excitateur ou inhibiteur en fonction des tissus étudiés et de la concentration de l'hormone (Mahesh, Brann and Hendry, 1996). Les effets sur la mémoire sont controversés. Si la progestérone est injectée en chronique avant un apprentissage, elle va aboutir à une dégradation de la mémoire (Bimonte-Nelson *et al.*, 2004) alors qu'appliquée en aigüe après l'entrainement elle va participer à augmenter les performances cognitives (Walf, Rhodes and Frye, 2006). La progestérone apparait être, tout comme les œstrogènes, un modulateur à la hausse comme à la baisse des fonctions cognitives. Par exemple, il a été montré en clinique, en utilisant 3 doses de progestérone (300, 600 et 1200mg) chez des jeunes femmes de 18 à 24 ans, que plus la dose de progestérone est élevée, plus les performances dans des tâches mnésiques sont faibles (Freeman *et al.*, 1992). Chez des rattes âgés ovariectomisées, il a été mis en évidence une augmentation des performances cognitives dans des tâches de mémoire de travail (Bimonte-Nelson *et al.*, 2003) ou dans un test de MWM (Daniel *et al.*, 1997), cependant, l'administration de progestérone exogène diminue les performances de ces animaux (Bimonte-Nelson *et al.*, 2004). Chez des rattes ovariectomisées, il a été montré que l'association d'estradiol et de progestérone détériore l'acquisition lors d'un test MWM (Chesler and Juraska, 2000). Ensemble ces résultats suggèrent que la progestérone

diminue la cognition chez des femelles cyclées ou ovariectomisées. Sur la plasticité, il a également été montré que la progestérone, chez la ratte ovariectomisée, va diminuer la PLT sans altérer la DLT, suggérant que les effets de l'hormone serait sensible à la fréquence de stimulation (Foy, Akopian and Thompson, 2008). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les patientes montrent de meilleurs résultats à la suite d'un traitement à l'estradiol comparativement à un traitement à la progestérone, suggérant ici que l'estradiol possède de meilleures répercussions sur la cognition (Honjo *et al.*, 2005). Chez des rattes âgés ovariectomisées, les performances augmentent dans des tests de MWM sous traitement à l'estradiol mais on observe une atténuation de ces résultats sous traitement à la progestérone, confirmant les précédentes observations (Bimonte-Nelson *et al.*, 2006). Enfin, chez des souris agées et ovariectomisées, l'injection d'estradiol seul après l'entrainement permet d'améliorer la consolidation de la mémoire tandis que l'injection de progestérone en même temps que l'estradiol prévient l'amélioration de la mémoire induite par l'estradiol (Harburger, Bennett and Frick, 2007). Ainsi il apparait que la progestérone dessert la mémoire plus qu'elle ne la favorise. Néanmoins une partie de la communauté scientifique montre l'inverse. En effet, il a été mis en évidence que l'hormonothérapie de remplacement à base de progestérone chez les femmes ménopausées permettait d'augmenter la mémoire dans différentes tâches (Natale *et al.*, 2001). De la même manière, l'administration de progestérone augmente l'apprentissage verbal et la mémoire chez des femmes ménopausées ne présentant pas de signes de démence (Maki, Zonderman and Resnick, 2001). Chez des rattes âgées ovariectomisées, l'hormonothérapie de remplacement (estradiol + progestérone) 3 et 10 mois après la chirurgie permet d'augmenter la mémoire de travail alors qu'une thérapie à base d'estradiol seul n'a pas d'effet (Gibbs, 2000). Chez la souris ovariectomisée, il a été mis en évidence que la progestérone (10 et 20mg) augmente la reconnaissance d'objet mais que seule la dose de 10mg fonctionne chez des femelles âgées ovariectomisées (Lewis, Orr and Frick, 2008). Enfin, il a été montré chez des souris mâles et femelles que l'administration de progestérone va augmenter les performances des tâches liées à l'hippocampe comme le labyrinthe en T, la reconnaissance d'objet, la MWM, le test d'inhibition de la fuite ou encore le test de peur contextuelle conditionnée. Cependant, les auteurs n'observent pas d'effet sur des tests impliquant d'autres structures comme l'amygdale ou le striatum (Frye and Walf, 2008). Au sein de l'hippocampe, la progestérone va augmenter la survie des nouveaux

neurones dans le gyrus denté et est associée avec de meilleur résultat dans des tests de MWM chez la souris (Zhang *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces résultats montre la dualité de la progestérone qui agit à la fois comme activateur ou comme inhibiteur de différentes structures cérébrales. Son interaction avec les œstrogènes est également mise en avant, ce qui est intéressant dans notre étude puisqu'elle pourrait impacter directement nos résultats.

Concernant l'alcool à présent, il a été rapporté que l'éthanol diminue les niveaux de progestérone pendant le début de la phase folliculaire (phase pendant laquelle le taux de progestérone augmente) à la suite d'un traitement à la naltrexone (molécule utilisée chez les patients alcoolodépendants pour aider au maintien de l'abstinence) (Teoh *et al.*, 1988) et il est intéressant de noter que chez le singe habitué à boire de l'alcool, sa consommation augmente pendant cette même période (Dozier *et al.*, 2019). Il a également été montré qu'en réponse à une dose d'alcool aigüe (0,34 à 1,02 g/kg) on observait une diminution significative du taux de progestérone dans le plasma de femmes naturellement cyclées ou sous pilules contraceptives (Sarkola *et al.*, 1999). Toujours en clinique, il a été montré chez des jeunes femmes naturellement cyclées (18-22 ans) qu'un taux élevé d'estradiol concomitant à un taux faible de progestérone est associé à une augmentation du risque de consommer de l'alcool (Martel, Eisenlohr-Moul and Roberts, 2017). Ces résultats sont intéressants puisqu'ils montrent une association entre taux d'hormones et consommation d'alcool, notamment chez des jeunes femmes normalement cyclées représentant dans notre société une population à risque au regard de la pratique du *binge drinking*.

Aussi et pour mettre en évidence l'implication de la progestérone dans notre expérience, nous pourrions utiliser un antagoniste pouvant bloquer les récepteurs PRA et PRB afin d'observer si une répercussion est visible sur la plasticité de l'hippocampe. Au vu de la littérature, il est possible que cela n'engendre pas, ou peu de différence puisque l'estradiol semble posséder des propriétés plus importantes sur les processus mnésiques que la progestérone. Toutefois, il est possible que la présence de progestérone potentialise l'effet de l'estradiol et que sans sa présence, l'estradiol ne puisse pas induire de modification assez importante pour altérer la plasticité dès 24h au contact de l'éthanol. Pour rappel, contrairement au cycle hormonale que l'on retrouve chez la femme, où pics d'œstrogènes et de progestérone ont plusieurs jours de décalage, les pics endogènes des hormones sexuelles

chez la ratte sont relativement proches, espacées de quelques heures, et survenant pendant la phase de prœstrus. Ainsi, il est possible que la forte éthanolémie concomitante au pic d'œstrogènes dans notre étude côtoie également un pic de progestérone. Dans le cas où cette hypothèse serait vraie, elle renforcerait la nécessité de prendre en compte le cycle hormonal ainsi que l'utilité de notre modèle expérimental permettant d'observer l'interaction de l'éthanol avec un système hormonal complexe et naturel pendant une période où la présence de ces hormones est nécessaire à la maturation cérébrale.

3.2 Thérapie hormonale, alcool et mémoire

Les thérapies hormonales sont utilisées principalement chez les femmes que ce soit comme moyen contraceptif avec les pilules œstro-progestatives ou progestatives, ou en remplacement de la perte de production d'hormones survenant à la ménopause. Cet apport exogène en hormones n'est pas sans conséquences, notamment sur les capacités cognitives des individus. Chez les femmes, le cycle naturel est un bon moyen non invasif d'étudier les répercussions des hormones sur différentes fonctions, y compris la mémoire. Pour cela, la période du cycle est contrôlée, le plus souvent par prises de sang et questionnaires, et les femmes doivent effectuer des tâches interrogeant différentes fonctions cognitives pendant 2 périodes de leur cycle. La première, en début de phase folliculaire (2 – 5 jours du cycle), présente un taux faible d'hormones œstrogènes et progestérone, tandis que la seconde, au milieu de la phase lutéale (19 – 24 jours de cycle) présente un taux élevé d'hormones.
Hampson montre ainsi que pendant un taux élevé d'hormones sexuelles, correspond à la phase lutéale, les femmes présentent de meilleurs performances dans des tâches d'articulation verbale et de contrôle moteur fin tandis que, pendant un taux bas en hormones sexuelles, elles présentent une augmentation des performances dans des tâches visuo-spatiale (Hampson, 1990a, 1990b). Ces résultats suggèrent que dans un cycle naturel, les hormones modulent différentes fonctions cérébrales et ne seraient pas nécessairement bénéfiques pour les capacités cognitives puisqu'ici un faible taux d'hormones est associé à de meilleures performances spatiales. Cependant, Il a également été montré que pendant la phase où il y a le plus d'hormones circulantes, les femmes naturellement cyclées présentent de meilleurs résultats dans un travail de mémoire verbale implicite (Maki, Rich and Shayna Rosenbaum, 2002) ainsi qu'une diminution des performances de rappels de figures

géométriques (Phillips and Sherwin, 1992). On retrouve ainsi la complexité du système hormonal qui ne présentent pas les mêmes effets en fonction du type de mémoire explorée.

L'utilisation de contraceptif oral (CO) va modifier les taux d'hormones circulants. En effet, la pilule œstro-progestative va bloquer le système hormonal dans une boucle de rétrocontrôle négatif. Pour faire simple, la libération hormonale va dépendre de l'axe hypothalamo-hypophysaire qui va réguler la production des hormones sexuelles via la libération de deux hormones : la LH et la FSH. Dans un cycle naturel, l'estradiol produite par l'ovocyte va inhiber la production de LH et de FSH, ce qui va permettre de n'avoir qu'une légère augmentation du taux d'œstrogènes dans le corps. Une fois une certaine concentration seuil d'œstrogènes atteinte, le rétrocontrôle des œstrogènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire devient positif, entrainant un pic de libération de LH et de FSH qui déclenchera l'ovulation (Figure 27). L'utilisation de contraception orale va permettre de maintenir les taux d'œstrogènes circulants sous ce seuil et ainsi maintenir une libération de LH et de FSH suffisamment basse pour empêcher l'ovulation. De plus, la présence de progestérone à un taux constant, permet aussi de maintenir le système dans un état stable (Serfaty, Gabriel and Leclercq, 2009).

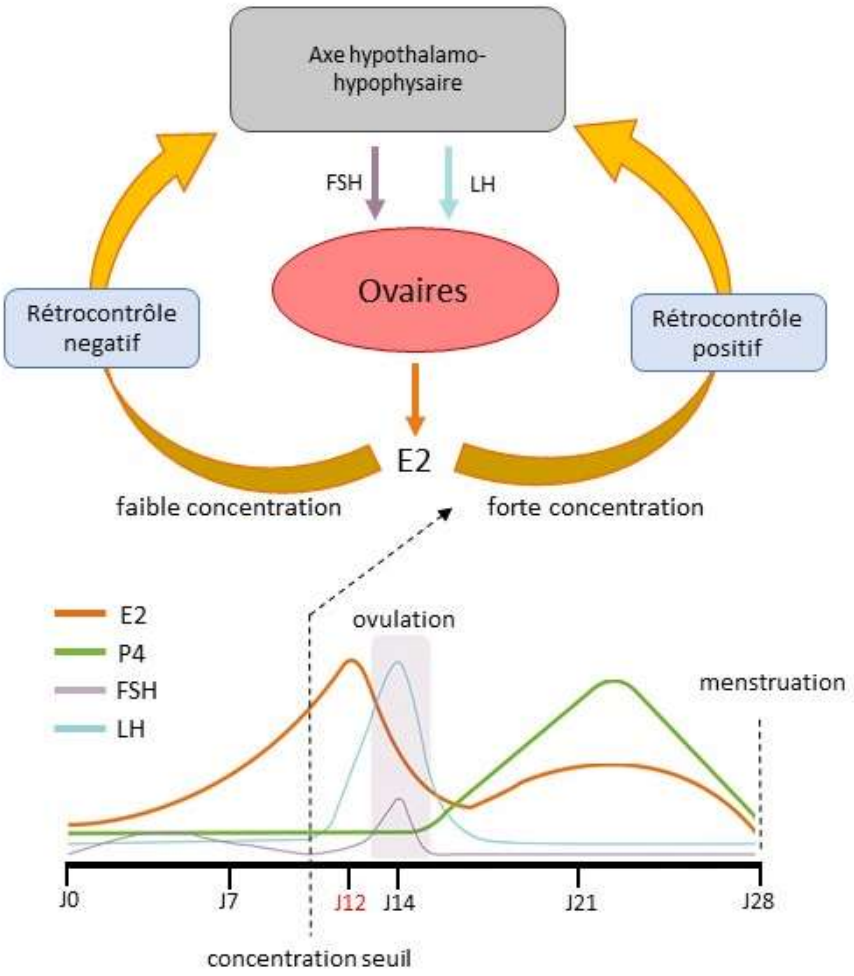


Figure 27: Représensation schématique de la régulation hormonale chez les femmes naturellement cyclées

Réalisé par Rabiant K.

Concernant les effets de ces contraceptifs oraux sur les performances cognitives, il a été montré que la prise de contraceptifs oraux va permettre de diminuer l'effet négatif du cortisol, l'hormone du stress, sur la mémoire (Kuhlmann and Wolf, 2005) puisque les utilisateurs de contraceptifs oraux se souviennent de plus d'images associées à une valence émotionnelle positive, que d'images associées à une valence émotionnelle négative comparativement à des femmes ne prenant pas de contraceptifs oraux ou d'hommes d'âge équivalent (moyenne d'âge 20 ans) (Person and Oinonen, 2019). Ces résultats suggèreraient que la prise de contraceptifs oraux pourrait altérer le rappel émotionnel négatif associé à un stimulus et améliorer la gestion du stress et l'effet qu'il peut avoir sur la mémoire spatiale. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de l'équipe de Mordecai montrant que les contraceptifs oraux diminuent les taux de cortisol sans impact négatif sur la mémoire pendant

les phases active et inactive de la pilule (Mordecai *et al.*, 2017). Pour rappel les contraceptifs oraux s'étalent sur un cycle complet de menstruation chez la femme avec une partie de ces pilules étant des placebos (constituant la phase dite « inactive » des contraceptifs oraux). Il a également été montré que la prise de contraceptifs oraux diminue la susceptibilité de développer une fausse mémoire dans un test de désinformation (Petersen, Patihis and Nielsen, 2015) en plus de générer un meilleur rappel de la mémoire essentielle (Nielsen *et al.*, 2011). Gogos a montré que les utilisateurs de contraceptifs oraux ont de meilleurs résultats dans des tâches de mémoire verbale (Gogos, 2013). Un résultat retrouvé par Mordecai et ses collaborateurs qui ont montré que les femmes naturellement cyclées ne montre pas d'effet du cycle sur la mémoire verbale à l'inverse des femmes sous contraceptifs oraux qui présentent de meilleures performances dans des tâches de mémoire verbale pendant la phase active des pilules (Mordecai, Rubin and Maki, 2008). Ces résultats sont intéressants puisque contre intuitifs car ce sont les femmes utilisant des contraceptifs oraux, et donc avec peu de modulation de leur taux hormonal, qui présentent une amélioration de leurs résultats à l'inverse des femmes naturellement cyclées chez qui l'effet du pic d'hormones n'est pas visible. Enfin, il a été montré chez des utilisateurs de contraceptifs oraux de meilleures performances dans des tâches de mémoire topographique comparativement aux femmes naturellement cyclées, et ce pendant les deux phases du cycle présentées plus haut (Bianchini *et al.*, 2018) soulignant également l'impact de ces contraceptifs sur la mémoire.

Aussi et puisque l'hypothèse de notre étude appuie sur la nécessité du pic d'œstrogènes dans la vulnérabilité des femmes vis-à-vis de l'éthanol, il serait intéressant de connaître la répercussion que peuvent avoir la prise de contraceptifs oraux sur les habitudes de consommation, mais également si l'éthanol interagit avec ces contraceptifs en altérant les capacités cognitives des utilisateurs. Il y a cependant peu d'études à ma connaissance s'intéressant à la question. Une étude en 1990 de Lund et Jacobsen a montré que la prise de contraceptifs oraux était associé avec une augmentation des habitudes de consommation d'alcool (Lund and Jacobsen, 1990). Cependant, les nouvelles générations de pilules contraceptives ayant beaucoup changées depuis les années 1990, il est possible que ce résultat soit maintenant caduque. On pourrait donc s'attendre à ne pas voir de modification dans les consommations d'alcool, puisque un fort taux d'hormones est associé avec un plus grand risque de consommer de l'alcool (Martel, Eisenlohr-Moul and Roberts, 2017) ainsi que

des répercussions moins importantes sur la plasticité. Pour étudier l'impact que peut avoir ces contraceptifs oraux sur l'hippocampe en recherche fondamentale, il faudrait doser et administrer une dose œstro-progestative chez des rattes naturellement cyclées et observer, si un effet apparait sur la plasticité avant d'étudier l'interaction croisé de ce mélange œstro-progestatif avec l'éthanol. Cette étude s'inscrirait dans une démarche expérimentale proche de celle effectuée dans ce travail de thèse qui fournirait donc une base de comparaison solide. Toutefois, et puisque notre étude n'a pas pris en compte les concentrations de progestérone endogène chez des rattes naturellement cyclées, il n'est pas impossible que nos résultats obtenus soient déjà le reflet d'une interaction entre l'éthanol, les œstrogènes, mais également la progestérone. Cependant, notre problématique rejoindrait celle précédemment proposée dans les perspectives impliquant la progestérone.

Enfin, concernant la thérapie de remplacement hormonale (TRH), principalement utilisée chez les femmes ménopausées, elle permet d'améliorer les capacités cognitives après l'arrêt de production d'hormones sexuelles endogènes comparativement à des femmes non traitées à la thérapie de remplacement hormonale (Stephens, Pachana and Bristow, 2006; Doty *et al.*, 2015). Lorsqu'étudiés indépendamment, il est mis en évidence les effets bénéfiques des œstrogènes et de la progestérone chez des femmes ménopausées dans différentes fonctions cognitives, soulignant encore l'action de ces hormones sur des cibles particulières (Berent-Spillson *et al.*, 2015). Enfin, il est intéressant de noter qu'il a été montré une relation positive entre la prise modérée d'alcool et la thérapie de remplacement hormonale à l'estradiol sur la cognition chez la femme ménopausée. En utilisant des tests évaluant des performances de mémoires épisodique et de connaissance chez près de 300 femmes ménopausées, Tivis et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction entre la thérapie de remplacement hormonale à l'estradiol et l'éthanol dans la cognition bien que les auteurs précisent que d'autres variables doivent être pris en compte pour expliquer ces résultats (Tivis *et al.*, 2008).

Ainsi, la relation entre les hormones sexuelles et la cognition n'est plus à débattre. Cependant la complexité de cette relation est encore à éclaircir puisque plusieurs mécanismes d'action sont encore incertains. La capacité de ces hormones à moduler les propriétés cognitives des différentes structures, ainsi que l'interaction potentielle entre elles et d'autres molécules, telle que l'éthanol, rendent l'étude hormonale particulièrement compliquée.

3.2 Œstrogènes et circuit de la récompense

L'éthanol, comme toutes les drogues d'abus, provoque une augmentation de la libération de dopamine, surnommée « l'hormone du plaisir », par les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale appartenant au circuit de la récompense étroitement connecté à l'hippocampe (Di Chiara and Imperato, 1985, 1988). Ce résultat a été par la suite confirmé chez l'Homme (Boileau *et al.*, 2003). Ainsi, la consommation d'alcool est associée avec une augmentation de la libération dopamine qui participe à la consolidation de la mémoire, probablement grâce à l'activité métabotropique des récepteurs à la dopamine (pour revue voire (Arias-Carrión and Pöppel, 2007)). De plus, comme nous l'avons précisé précédemment, l'œstradiol est associée à une plus grande consommation d'alcool dans la plupart des modèles utilisés (voir chapitre « Les œstrogènes », 6. Interaction œstrogènes et éthanol, page 138). Il n'est pas improbable que cette augmentation de consommation d'alcool soit associée avec une altération de la perception du plaisir pendant cette consommation, impliquant donc le système de la récompense. L'équipe de Dazzi a mis en évidence les capacités de l'estradiol à agir sur ce circuit, et plus particulièrement sur les taux de dopamine au niveau du cortex préfrontal. Leurs résultats suggèrent une interaction particulière entre l'estradiol et l'éthanol, pouvant à la fois inhiber ou amplifier les effets de l'éthanol sur la libération de dopamine, en fonction de la concentration d'estradiol présent dans la structure ciblée par l'alcool (Dazzi *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que, tout comme notre étude, ces auteurs ont mis en évidence une coopération entre l'éthanol et l'estradiol dans une autre structure cérébrale, le cortex préfrontal, communiquant avec l'hippocampe. Ainsi, en utilisant des rats, Dazzi et ses collaborateurs ont montré que la concentration de dopamine varie pendant le cycle ovarien, en étant la plus élevée lors de l'œstrus (faible concentration en œstrogènes), et la plus faible lors du prœstrus (concentration en œstrogènes élevée). De plus, l'injection par voie intrapéritonéale d'éthanol (0,5g/kg) permet d'augmenter la libération de dopamine (+50%) chez les femelles en œstrus, mais n'a pas d'effet chez les femelles en prœstrus, suggérant que la présence d'estradiol bloquerait l'augmentation de la libération de dopamine induite par l'éthanol. Cependant, les femelles ovariectomisées ou prétraitées avec des antagonistes des ERs ne montrent pas d'augmentation de la libération de dopamine induite par l'éthanol, tandis que l'injection d'estradiol exogène permet de récupérer cette augmentation de libération de dopamine induite par l'éthanol (Dazzi *et al.*, 2007). Ainsi, les auteurs montrent que les

œstrogènes endogènes diminuent la libération de dopamine et prévient l'augmentation de cette libération induite par l'éthanol. Cette altération de libération de l'hormone du plaisir peut être l'un des facteurs responsables de l'augmentation de consommation observée en préclinique.

Dans ce système de la récompense, il a également été mis en évidence que lors du pic d'œstrogènes chez la souris, on observe une augmentation de l'excitation produite par l'injection d'éthanol, ainsi que de l'inhibition produite par l'injection de dopamine sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Vandegrift *et al.*, 2017), structure clé du circuit de la récompense. Ces résultats renforcent la position de l'estradiol comme modulateur de la sensation récompensante de l'éthanol puisque l'utilisation d'antagonistes des ERs ou l'ovariectomie, va diminuer l'effet excitateur de l'éthanol sur ces neurones dopaminergiques. De plus, l'injection d'estradiol chez des souris ovariectomisées permet de récupérer les effets observés de l'éthanol chez les femelles intactes pendant le pic d'œstrogènes endogènes, soulignant encore l'action de l'estradiol dans l'amplification de la valeur récompensante de l'alcool au niveau du ATV (Vandegrift *et al.*, 2017).

Une autre étude de Hilderbrand et Laseck a montré l'implication de l'estradiol dans cette valeur récompensante de l'alcool chez des souris en utilisant un test de PPC (Préférence de Place Conditionnée). Ce test se déroule dans une boite à deux compartiments suffisamment distincts pour que l'animal puisse y développer une préférence. Cette technique permet de tester la valeur récompensante d'une drogue qui sera associée à l'un des deux compartiments. Si l'animal passe plus de temps dans la chambre où il reçoit la drogue, cette dernière peut être considérée comme ayant une valeur récompensante plus grande pour l'animal. Ainsi, ces chercheurs ont utilisé la PPC pour évaluer la valeur récompensante de l'alcool chez des souris ovariectomisées, en fonction du taux d'estradiol. Ils ont pu mettre en évidence que l'injection d'estradiol augmente la PPC liée à l'éthanol tandis que l'utilisation d'agoniste spécifique de ERα ou ERβ n'ont pas d'effet individuellement. Cependant, la co-injection des agonistes permet d'augmenter la PPC liée à l'éthanol, suggérant que l'estradiol module l'effet récompensant de l'éthanol en agissant sur ces deux récepteurs en même temps (Hilderbrand and Lasek, 2018). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse de l'existence d'une relation entre estradiol et circuit de la récompense impliquant les deux ERs. Le circuit de la récompense étant lié à l'hippocampe, à la fois par des projections provenant de l'aire tegmentale ventrale, mais également par des projections de l'hippocampe vers le noyau accumbens, il est possible que

les altérations que nous constatons dans notre étude, participe directement à impacter la sensation récompensante de l'alcool chez les femelles et à la mise en place de la « mémoire pathologique » (Figure 28).

Ainsi, lors d'une consommation d'alcool, l'estradiol va augmenter la libération de dopamine de l'ATV qui va se projeter sur le noyau accumbens, responsable de la sensation de plaisir, mais également sur l'hippocampe. Ce dernier, au contact de l'éthanol et de l'estradiol, présenteraient des capacités de plasticité synaptique altérées pouvant être liées à un encodage erroné de l'expérience, créant une mémoire tronquée lors de la consommation. Enfin, l'hippocampe projette également sur le noyau accumbens permettant une association entre un comportement et un souvenir (Trouche *et al.*, 2019).

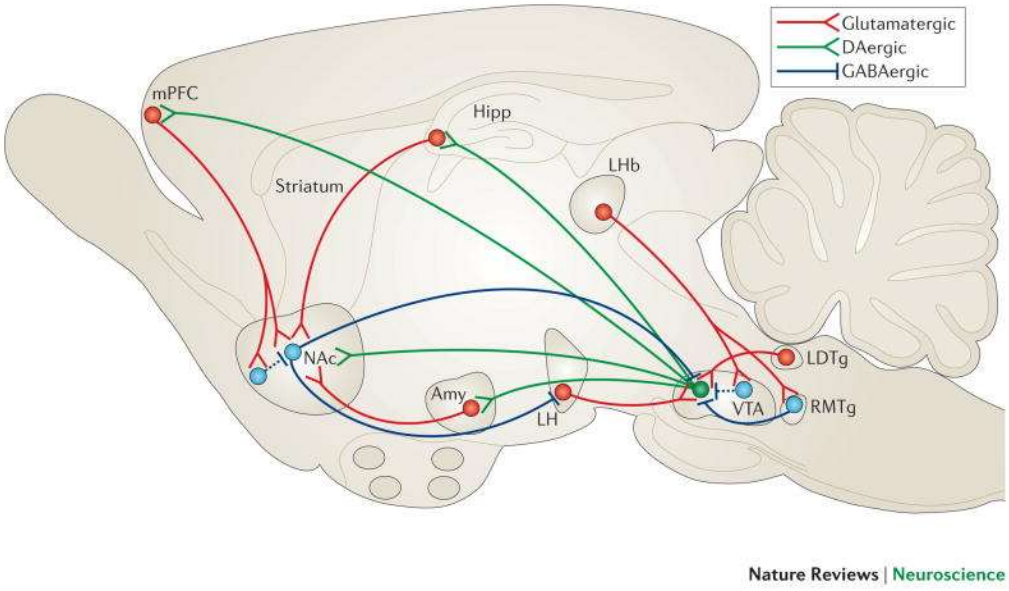


Figure 28: Représentation schématique des connexions du circuit de la récompense dans un cerveau de rat.

Abréviations : mPFC : cortex préfrontal médian ; Hipp : hippocampe ; LHb : *habenula* lateral ; NAc : noyau accumbens ; Amy : amygdale ; LH : hypothalamus latéral ; VTA : aire tegmentale ventrale ; LDTg : tegmentum dorsal latéral ; RMTg : tegmentum rostromedial.

extrait de (Russo and Nestler, 2013)

4 Conclusion générale

L'objectif de cette thèse a été de mettre en évidence l'implication des œstrogènes dans les perturbations de la plasticité de l'hippocampe induites par deux alcoolisations ponctuelles importantes chez les rattes adolescentes. Nous avons montré que la vulnérabilité des femelles vis-à-vis de ce type d'alcoolisation était en partie causée par la présence d'œstrogènes, qu'ils soient endogènes avec le cycle œstral, ou exogène, lors d'une injection de 17β-estradiol. Cette vulnérabilité se traduit par une abolition de la dépression à long terme plus rapide, survenant 24 heures plus précocemment que chez les mâles, avec une implication des récepteurs aux œstrogènes α et/ou β ainsi que de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA, à l'instar des mâles adolescents. Cependant, nous avons mis en évidence que l'impact des œstrogènes n'étaient pas uniquement féminins puisque des résultats similaires sont visibles chez les mâles adolescents mais que l'âge des animaux reste un facteur important puisque nos résultats ne sont pas reproductibles chez les animaux adultes, bien que nous observons des effets similaires chez les femelles prépubères. Aussi notre travail fourni une piste sur les mécanismes de plasticité impliqués dans les différences cognitives entre les hommes et les femmes lors d'une consommation d'alcool en proposant des arguments incriminant les œstrogènes.

Chapitre 5 :

Autres travaux réalisés pendant ma thèse

Plasticité et Alcoolodépendance chez les rats adultes.

L'alcoolodépendance est un problème de santé publique majeur dans notre société. En France, c'est près de 10% de la population qui est touché par le mésusage de l'alcool, soit près de 2 millions de français présentant une alcoolodépendance et 3 millions présentant une consommation à risque selon l'OFDT. Les répercussions d'une telle consommation sont importantes sur le cerveau et affectent d'autres structures, expliquant sa présence dans la littérature scientifique. Le modèle pour étudier ce type de consommation est l'intoxication aux vapeurs d'éthanol initialement mise en place pour induire des symptômes de sevrage et de dépendance que l'on retrouve chez les patients alcoolodépendants (Goldstein et Judson, 1971). L'utilisation de ce paradigme permet d'obtenir des éthanolémie de plus de 1,5g/L et des troubles neurologiques et comportementaux typiques de l'alcoolodépendance. Parmi les souches de rongeurs utilisés, il a été montré que les rats Wistar sont particulièrement sensibles à ce protocole, présentant une consommation d'alcool fortement accrue à la suite de l'exposition aux vapeurs d'éthanol (Aufrère et al., 1997). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux répercussions de ce protocole sur la plasticité de rats mâles et femelles adultes à la suite d'une courte (12h) ou d'une longue (5 à 7 jours) période de sevrage. Pour répondre à cette question, les rats ont subi un protocole d'inhalation de vapeurs d'éthanol par des cycles d'intoxication et d'abstinence de 12h chacun pendant plus de 8 semaines avant d'être sacrifié 12h ou 5 à 7 jours après l'arrêt de l'inhalation. Nous avons mesuré la PLT et la DLT au niveau du *stratum radiatum* du CA1 mais également le PPF (paire-pulse facilitation), forme de plasticité à court terme permettant d'étudier la composante présynaptique. Si nous n'avons pas mesuré de différence entre les 2 périodes de sevrages étudiées (données non présentées), nous avons mesuré une différence entre les sexes. Chez les mâles, s'il est possible d'induire PLT et DLT chez des animaux contrôles d'âge équivalent (120 à 200 jours), il n'est pas possible d'induire de DLT chez des animaux dépendants, la PLT restant inchangée. De plus, nous n'avons pas mis en évidence l'implication de l'élément présynaptique dans ces phénomènes. Concernant les femelles, nous n'observons pas d'effet de la dépendance chez les animaux puisque nous ne sommes pas parvenus à induire de la PLT et la DLT demeure robuste dans les deux cas. Ces résultats suggèrent une différence liée au genre dans les

adaptations des rats soumis aux vapeurs d'éthanol. Ces dernières induisent des modifications robustes des capacités de plasticité synaptique chez les mâles perdurant lors d'une période de sevrage prolongée tandis que chez les femelles, les vapeurs ne semblent pas avoir d'effet sur la plasticité.

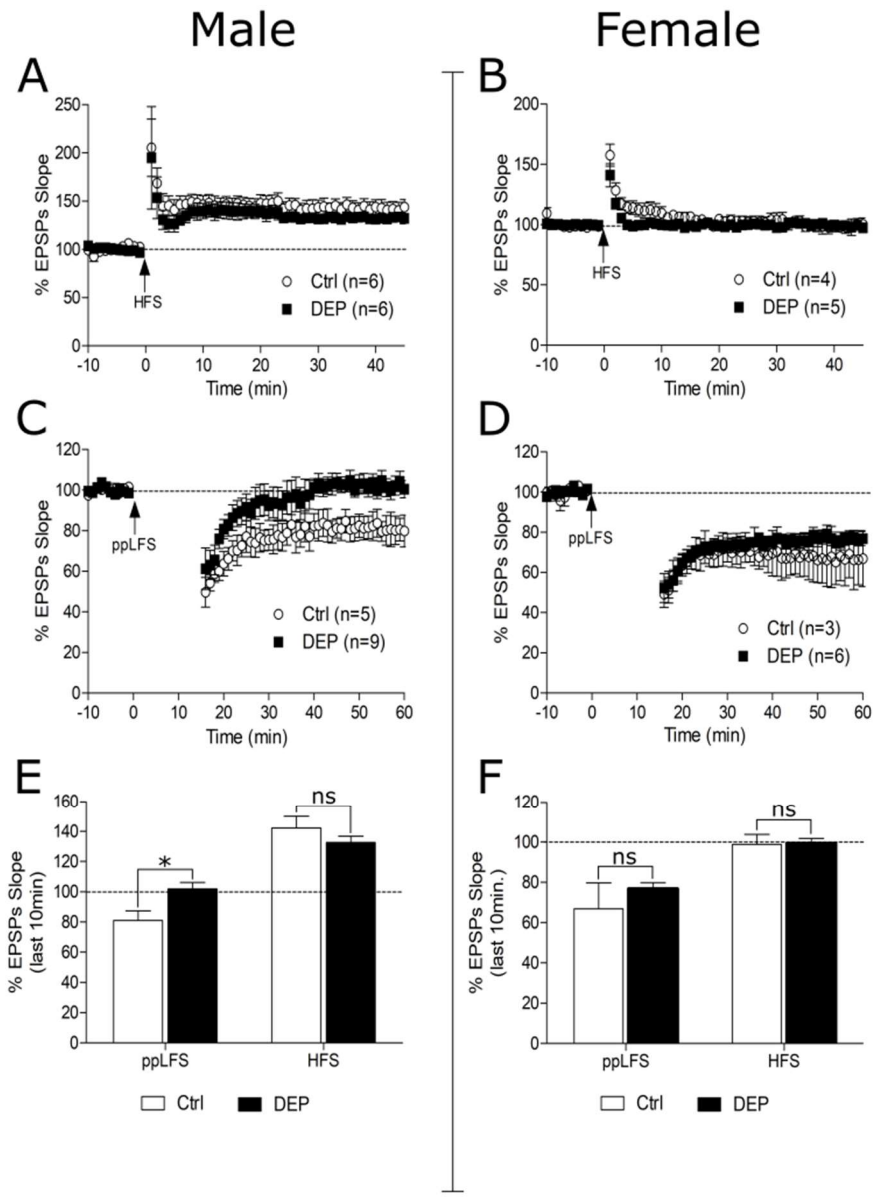


Figure 1: Impact of withdrawal on hippocampal synaptic plasticity in ethanol dependent male and female rats. Ethanol dependence was induced by intermittent ethanol vapors for more than 8 weeks and animals were tested after either 12h or 5 up to 7 days of withdrawal when there are no alcohol in blood. Since delay of withdrawal displayed no difference, groups were pull into a single one. **A)** Ethanol dependence doesn't not alter LTP in male rats. **B)** Female rats don't display LTP in either Ctrl or dependent group. **C)** After a withdrawal period, dependent male rats show an abolition of LTD. **D)** Ethanol dependence doesn't alter LTD in female rats. **E)** Bargraphs summing up male results with statistical differences. **F)** Bargraphs summing up female results with no statistical differences (Student t-test as used for analysis, * is $P < 0.05$ and ns = non significant).

Maladie d'Alzheimer et modulation de la plasticité synaptique par les peptides circulants

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative associée à la démence. En France, on estimait à 900 000 personnes le nombre de personnes atteints de cette maladie en 2015 avec chaque année plus de 225 000 nouveaux cas répertoriés (Fondation Recherche Alzheimer). La MA touche principalement les personnes âgées, avec près de 15% des cas ayant plus de 80 ans, mais peut également survenir plus tôt. Parmi les symptômes les plus robustes de la maladie, on retrouve une atteinte de la mémoire, d'abord légère puis sévère, aboutissant jusqu'à un oubli total des souvenirs les plus importants des patients, accompagner d'autres atteintes neurologiques comme la désorientation, la confusion, des difficultés à s'exprimer, à avaler et même à marcher (Alzheimer's Association, 2012). Pendant ma thèse il m'a été proposé de participer à la rédaction d'une revue sur Alzheimer, et plus particulièrement l'implication des peptides circulants dans la maladie. En plus des mécanismes de régulation précédemment présentés dans ce manuscrit, la plasticité synaptique peut être moduler par de petites molécules et parmi elles, des peptides synthétisés par différentes structures cérébrales. Cette revue propose de faire le point sur la littérature existante traitant de l'implication de ces peptides sur la plasticité synaptique dans différents modèles animaux ainsi que l'altération des taux circulant de ces molécules dans différentes modélisations de la maladie d'Alzheimer.

Accepted Manuscript

Title: Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: involvement in Alzheimer's disease

Authors: Stéphane Peineau, Kevin Rabiant, Olivier Pierrefiche, Brigitte Potier

PII: S1043-6618(17)31520-7
DOI: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.018
Reference: YPHRS 3804

To appear in: *Pharmacological Research*

Received date: 24-11-2017
Revised date: 23-1-2018
Accepted date: 26-1-2018

Please cite this article as: Peineau Stéphane, Rabiant Kevin, Pierrefiche Olivier, Potier Brigitte.Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: involvement in Alzheimer's disease.*Pharmacological Research* https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.018

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Synaptic plasticity modulation by circulating peptides and metaplasticity: involvement in Alzheimer's disease.

Peineau Stéphane [1,2], Rabiant Kevin [1], Pierrefiche Olivier [1], Potier Brigitte [3]

1 GRAP UMR1247, INSERM, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.

2 Centre for Synaptic Plasticity, School of Physiology, Pharmacology & Neuroscience, University of Bristol, Bristol, UK.

3 Laboratoire Aimé Cotton, CNRS-ENS UMR9188, Université Paris-Sud, Orsay, France.

Correspondence to : brigitte.potier@u-psud.fr; Olivier.pierrefiche@u-picardie.fr; stephane.peineau@inserm.fr

Acknowledgment/funding:

SP is supported by Medical Research Council (MR/K023098/1) and is holder of the chair of excellence "Synaptic Plasticity" funded by Région Hauts de France.

Keywords

Synaptic plasticity; learning and memory; Long Term Depression; LTD; Long Term Potentiation; LTP; Alzheimer's disease; β-amyloid protein; Aβ; neuroinflammation; homeostasis; neuropeptides; cytokines; growth factors; chemokines; metaplasticity; neuromodulation

Abbreviation

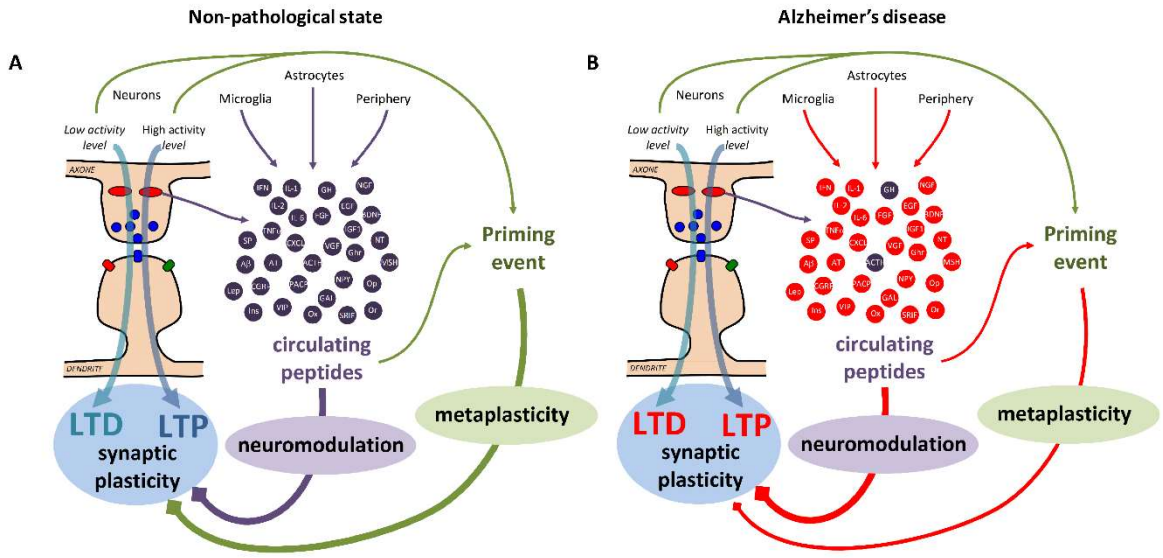
Aβ, β-amyloid; Aβo , oligomers of Aβ; ACTH, Adrenocorticotropic hormone; AD, Alzheimer's disease; AMPA, Amino-3-(3-hydroxy-5-Methyl-isoxazol-4-yl) Propanoic Acid; APP, amyloid-precursor protein; AT, Angiotensin; BBB, blood brain barrier; BCM, Bienenstock, Cooper and Munro; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CA, Ammon's horn (*Cornu Ammonis*); CGRP, Calcitonin gene-related peptide; CP-GluA, Calcium permeable GluA; CNS, Central nervous system; CXCL, Fractalkine; DG, Dentate Gyrus; E-LTP, Early-LTP; EGF, Epidermal growth factor; FAD, familial AD; FGF, Fibroblast growth factor; GAL, Galanin; GH, Growth hormone; Ghr, Ghrelin; GluA, AMPA receptor; GluN, NMDA receptors; IFN, Interferon; IGF1, Insulin-like growth factor 1; IL, Interleukin; Ins, Insulin; L-LTP, Late-LTP; Lep, Leptin; LTD, Long term depression; LTP, Long term potentiation; MCI, Mild cognitive impairment; mGlu, metabotropic glutamate receptor; MSH, Alpha-melanocyte-stimulating hormone; NFT, Neurofibrillary

tangles; NGF, Nerve growth factor; NMDA, N-Methyl-D-Aspartate; NPY, Neuropeptide Y; NT, Neurotrophin; Op, opioids; Or, Orexin; Ox, Oxytocin; PACP, Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide-38; PRP, Plasticity-related protein; RyR, Ryanodine receptor; SP, Substance P; SRIF, Somatostatin; STC, Synaptic tagging/capture; STDP, Spike-timing-dependent plasticity; TBS, Theta-burst stimulation; TNF, Tumor necrosis factor; VGF, Granin family; VIP, Vasoactive intestinal peptide.

Abstract

Synaptic plasticity is a cellular process involved in learning and memory whose alteration in its two main forms (Long Term Depression (LTD) and Long Term Potentiation (LTP)), is observed in most brain pathologies, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD). In humans, AD is associated at the cellular level with neuropathological lesions composed of extracellular deposits of β-amyloid (Aβ) protein aggregates and intracellular neurofibrillary tangles, cellular loss, neuroinflammation and a general brain homeostasis dysregulation. Thus, a dramatic synaptic environment perturbation is observed in AD patients, involving changes in brain neuropeptides, cytokines, growth factors or chemokines concentration and diffusion. Studies performed in animal models demonstrate that these circulating peptides strongly affect synaptic functions and in particular synaptic plasticity. Besides this neuromodulatory action of circulating peptides, other synaptic plasticity regulation mechanisms such as metaplasticity are altered in AD animal models. Here, we will review new insights into the study of synaptic plasticity regulatory/modulatory mechanisms which could influence the process of synaptic plasticity in the context of AD with a particular attention to the role of metaplasticity and peptide dependent neuromodulation.

Graphical abstract



1) INTRODUCTION.

Long-term synaptic plasticity, defined as long-lasting modifications of synaptic strength between connected neurons, is largely considered as the cellular basis of learning and memory processes [1]. Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), the major forms of long-lasting changes in synaptic strength in the vertebrate central nervous system, have attracted much of the attention for their possible role in memory [2]. Learning and memory are dependent on brain regions such as cortical areas and hippocampus, which express a high level of dynamic performances and regulation/modulation mechanisms to sustain the adaptability and flexibility required for the formation and storage of memory traces.

Dysregulation of synaptic plasticity participate to many pathological and neurodegenerative brain disorders [3]. Among those, Alzheimer's disease (AD) is a complex chronic neurodegenerative disorder, comprising a progressive and irreversible memory loss and cognitive decline. AD can only be diagnosed post-mortem, and is characterized by two major types of neuropathological lesions in the brain: i) extracellular deposits or senile plaques, consisting of β-amyloid (Aβ) protein aggregates (residues 1-40/42), and ii) intracellular neurofibrillary tangles (NFT), composed of abnormally hyperphosphorylated Tau protein aggregation in hippocampal and cortical regions involved in learning and memory. The "amyloid cascade hypothesis" is until now the leading theory to explain the neurodegeneration time-course of AD. Interestingly, cognitive impairments are not correlated to the number of senile plaques, but synaptic failure occurring before the formation of amyloid deposits is the best correlate of cognitive decline in AD patients and in animal models of the disease [4, 5]. Indeed, soluble oligomers of Aβ (Aβo) generated at early stages, and that are deposited in an aggregated form only at more advanced stages of the disease, have been identified to be highly toxic to synapses [6, 7].

Measures of LTP and LTD amplitude are overwhelmingly used in various experimental conditions and animal models as an index of synaptic plasticity performance and integrity. The effects of acutely applied exogenous Aβo from different origins (synthetic, secreted from AD transgenic cells or extracted from AD patients' brain) on synaptic function have been extensively studied *in vivo* or in *ex vivo* hippocampal slices. All the collected data led to the same conclusion that Aβo at pathological concentrations rapidly disrupts synaptic plasticity, illustrated by a loss of LTP and an enhancement of LTD [8].

However, acute applications of Aβo are far from representative of the AD continuum [9]. For a better modelling of the disease, numerous transgenic animal models of AD have been generated. They represent more integrated approaches to examine the chronic effects of Aβo on neurons assemblies and networks. Many of these models are based on the overexpression into the mouse genome of familial AD (FAD)-linked mutated genes, and magnitudes of LTP and LTD have been

measured to study synaptic plasticity deficits. Importantly, the diversity in the results of LTP/LTD measurements across the most relevant models of AD may reflect a greater diversity in synaptic dysfunctions [10] in AD that we may expect, in addition to many other experimental, age or strain sources of variations. Such high level of complexity in synaptic dysfunctions may be illustrated by compensatory or mal-adaptive mechanisms that could be induced at the network level in order to sustain synaptic plasticity against the deleterious impact of Aβo. That Aβo could chronically challenge the regulation/modulation mechanisms of plasticity opened a recent area of research on metaplasticity and neuromodulation of synaptic plasticity in AD. Importantly, metaplasticity and neuromodulation of synaptic plasticity may involve several different factors. Among these, circulating peptides are interesting candidates since they have been shown to modulate synaptic plasticity capabilities and especially in cases where their own concentration is altered because of a pathological situation. Therefore, the aim of our review is to present recent insights into the study of regulatory/modulatory mechanisms of synaptic plasticity, such as metaplasticity and the neuromodulatory action of circulating peptides that could influence the process of synaptic plasticity in the context of a chronic neurodegenerative disease such as AD.

2) Canonical LTP and LTD in AD.

Synaptic Hebbian plasticity can be observed at every glutamatergic synapse in the brain and is bidirectional [2]. Synaptic strength, defined as the magnitude of the postsynaptic signal in response to a presynaptic activation, can either be increased relative to basal synaptic transmission and is then called “Potentiation”, or decreased and then called “Depression”. In addition to its direction after induction, synaptic plasticity duration is time-dependent. This evolution with time is paralleled with different cellular mechanisms, and a short-term or early phase lasting from milliseconds to several minutes, and a long-term or late-phase, lasting for several hours or days and presumably even longer *in vivo*, can be distinguished. Many different forms of synaptic plasticity are described, at least experimentally, depending on their induction and maintenance pathways [11, 12]. A physiological basic property of Hebbian synaptic plasticity is its input-specificity, i.e. only the activated ensemble of postsynaptic synapses expresses potentiation or depression. This form of plasticity is called “homosynaptic”. On another hand, “heterosynaptic” plasticity may occur when plasticity is expressed in unstimulated set of postsynaptic synapses.

2.1 LTP and LTD.

Since its discovery at the perforant path synapse in the hippocampus *in vivo* [13], LTP has been most extensively studied in the Ammon's horn (CA, *Cornu Ammonis*) 1 and Dentate Gyrus (DG) areas of the hippocampus [14]. LTP is temporally subdivided into a short-term phase (early- or E-LTP) that can be followed or not by a long-term phase of potentiation (late- or L-LTP), and these two phases are sustained by different cellular pathways. L-LTP (> 3h) requires *de novo* protein synthesis, as it can be suppressed by anisomycin, a protein synthesis inhibitor, and may involve structural changes in addition to functional changes. E-LTP (< 1h) is mainly sustained by the recruitment of additional postsynaptic 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-Methyl-isoxazol-4-yl) Propanoic Acid (AMPA) receptors (GluAs), sourced either from an intracellular reserve pool by exocytosis or from nearby extra-synaptic receptors pre-existing on the neuronal surface [15]. In both hippocampal DG and CA1 areas, the induction of LTP is dependent on the activation of glutamate N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors (GluNs) (referred as LTP in this review) [16]. However, other forms of LTP are also described, such as GluN-independent LTP at the mossy fiber-CA3 synapse in the hippocampus [14] or dedepression, an LTP form induced on depressed synapses [17, 18].

Interestingly, the world of LTD is more diverse than LTP since many different forms have been identified. The canonical form of LTD, called *de novo*, can be experimentally induced from baseline activity after specific low-frequency electrical stimulations in slices. When LTD is triggered on a potentiated synapse, it is referred to as depotentiation. Most of the studied LTD forms implied activation of GluN and/or metabotropic glutamate receptors (mGlus) even if other induction mechanisms start to be uncovered. In hippocampal slices, alongside with the electric stimulus induced forms of LTD, several chemical forms can be obtained by exogenous activation of GluN, mGlu or muscarinic agonists for example. This reveals that different cellular induction mechanisms can be the source of LTD in the hippocampus [12].

2.2 Aβ as a modulator of LTP and LTD.

2.2.1 Physiological role of Aβ on synaptic plasticity.

Aβ derives from the cleavage of the amyloid-precursor protein (APP) that undergoes a complex proteolytic processing catalyzed by α–, β– and γ-secretases generating several fragments [19, 20]. Aβ is normally produced throughout life in the healthy brain and growing evidence indicates that it might have a physiological function on synapses. Importantly, effects of Aβ on synaptic function have been

shown to be dose-dependent. Physiological picomolar levels of extracellular Aβ peptides are likely to play neurotrophic and neuroprotective roles [21-24], whereas nanomolar concentrations block learning and memory [25]. In this context, low picomolar amounts of exogenously applied Aβ enhance LTP *in vitro*, whereas higher doses induce aversive effects of LTP and memory in a hormetic fashion [24, 26-28]. A positive regulation of synaptic function by picomolar Aβ has been reported by increasing presynaptic glutamate release at hippocampal synapses and by facilitating LTP in CA1 [26, 27]. Moreover, physiological levels of Aβ may be essential for neurons, because preventing Aβ production by adding β- or γ-secretase inhibitors or antibodies in cultured neurons causes cell death, which can be rescued by applying synthetic Aβ peptides to culture medium [27]. Interestingly, Cirrito et al. have demonstrated that synaptic transmission induces an increase of Aβ production and release, and Kamenetz et al. proposed that endogenous Aβ might regulate synaptic plasticity through a negative feedback mechanism [29, 30]. Aβ could be therefore considered as a homeostatic regulator of synaptic activity level in physiological conditions.

2.2.2 Pathological role of Aβ on synaptic plasticity.

Synaptic failure is an early event in the pathogenesis of AD that is clearly detectable already in patients with mild cognitive impairment (MCI), a prodromal state of AD. During this early phase of AD, increasing extracellular Aβo level is strongly suspected to become synaptotoxic, turning its "friendly" to "foe" action onto synaptic function. Injection of synthetic or naturally secreted Aβo at nanomolar concentrations into cognitively unimpaired rodent brain is sufficient to induce memory loss by rapidly impairing learning and memory formation processes [31-35]. Multiple *in vitro* studies have implicated Aβo as a direct trigger of synaptic dysfunction (reviewed by [36]) in electrophysiological experiments [35, 37-39], by directly affecting the density and stability of dendritic spines [40], and by targeting several receptors present on the surface of dendritic spines, especially the GluN [41].

As synapse loss is preceded by defects in neuronal transmission and synaptic plasticity, it has been suggested that Aβo might be involved in the deregulation of these processes [42-46]. Acute exposition to Aβo induces a significant reduction of LTP in the hippocampus by disrupting the molecular processes involved in this form of plasticity [38, 47-56]. Moreover, Aβo extracted from AD human cortex has also been shown to facilitate LTD induction through activation of mGlus when applied to rat organotypic or *ex vivo* hippocampal slices [39]. *In vivo* injection of Aβ is reported to facilitate GluN-LTD and depotentiation in the CA1 region of the hippocampus [57], suggesting a sliding in the induction threshold for LTP/LTD, which becomes favorable for LTD at the expense of LTP. Effects on GluN-LTD are mediated by activation of extrasynaptic GluNs [58] through an excess of extracellular

glutamate generated by a disruption of astrocyte-dependent glutamate uptake by Aβo [59]. Aβo-driven activation of GluNs primes the activation of GluN-dependent metaplastic modulation of synaptic plasticity [60], lowering the induction threshold for LTD but increasing the one for LTP.

3) Synaptic plasticity modulation.

3.1 Physiological modulation of synaptic plasticity

3.1.1 Metaplasticity.

According to Hebb rule, LTP can further be expressed at previously activated synapses [61, 62]. This positive feedback is necessary for memory encoding and storage, but conversely, an unregulated facilitation of synaptic strength can lead to unstable runaway excitation or saturation across connected neural networks. Saturating LTP above physiological levels impairs learning and memory [60, 63]. Similarly, continuous synaptic depression during LTD could result in unnecessary synaptic silencing and elimination [61, 62]. Negative feed-back mechanisms encompassed under the term of "homeostatic plasticity" are then employed by neurons to sense and counteract destabilizing effects of LTP or LTD. These are fine-tuning mechanisms for plasticity, offering a compensatory refinement of synaptic strength to maintain the stability of network activity within physiological limits. Typically, synaptic scaling, spike-timing-dependent plasticity (STDP), and synaptic tagging/capture (STC) are metaplastic forms of synaptic plasticity. Metaplasticity is therefore defined as "the plasticity of synaptic plasticity" [63, 64] in the sense that the prior history of synaptic activity can interfere with subsequent induction of synaptic plasticity.

Typically, the induction thresholds for LTP and LTD can be regulated by metaplastic processes, in such a way that LTP induction will be more favorable in neurons whose previous synaptic activity was low, whereas LTD induction is preferred when previous activity was high. One illustration of metaplasticity is the computational model elaborated by Bienenstock, Cooper and Munro (BCM), in which the threshold for LTP and LTD induction is not static, but can be modified by prior glutamate receptor activation. This model was first enounced to illustrate synaptic plasticity rules in the visual cortex [65]. Some example of BCM theoretical work has also been found in the hippocampus [66, 67]. Metaplasticity contributes to physiological function of neuronal network and control of behavior. Some studies also showed that metaplasticity is expressed in the human cortex [68], where it plays a homeostatic role maintaining network activity within a physiological range. On the opposite, impaired metaplasticity may be involved in neurological, psychiatric and metabolic diseases [3, 67, 69].

3.1.2 Synaptic scaling.

Another form of homeostatic plasticity is synaptic scaling which controls signal strength when the activity is either increased or decreased. In mammalian central neurons, raising or lowering activity leads to a respective decrease or increase in the number of postsynaptic GluAs [70-72]. This provides the cell a unique ability to self-regulate its synaptic strength through an intrinsic negative feedback control. It may prevent too high or too low activity levels induced by LTP and LTD, or it may counteract pathological conditions, therefore restoring synaptic homeostasis [73]. These changes are accompanied by changes in the turnover of GluA associated proteins.

3.1.3 Synaptic tagging and capture.

The idea of synaptic tagging was proposed to explain how input specificity can be achieved during LTP [74-76]. L-LTP shares with long-term memory the involvement of new protein synthesis [77]. How to relate the *de novo* production in the cell body of plasticity-related proteins (PRPs) essential for the maintenance of LTP and long-term memory to LTP expression only at the activated synapses? To address this biological question, it was suggested that the activated synapses during LTP induction become tagged in a protein synthesis-independent manner. These tagged synapses then capture the PRPs required for the maintenance of LTP. An extension of synaptic tagging is the cross-capture (or synaptic tagging/capture, STC) model. It is suggested that a tag set by a weak stimulus or a weak memory trace captures part of the PRPs induced by a strong stimulus or a strong memory trace in two independent synaptic inputs of the same neuronal population. This tag-PRPs interaction converts short-term into long-term plasticity, and is implicated in the consolidation of memory [78]. The STC model explains the formation of memories in an associative and time-dependent manner [74, 78].

3.1.4 Neuromodulation of synaptic plasticity by circulating peptides

In addition to proper and metaplasticity regulation mechanisms, synaptic plasticity is controlled by extracellular circulating molecules released from synaptic and non-synaptic sites. Among those molecules are peptides like cytokines, neuro/glio-peptides, eicosanoids like prostanoïds and steroids. They are synthetized and released by different cell types throughout the brain or they may diffuse from the periphery, as several of these molecules are able to cross the blood brain barrier (BBB) [79, 80]. Neuropeptides in the central nervous system (CNS) have various roles. They may act as

neurotransmitter, neurohormone or neuromodulator, and they can influence many functions including learning, memory and behavior. Therefore and based on the diversity of roles the circulating neuropeptides may have, it is acknowledge that the fine-tuning of synaptic functions is directly dependent on the controlled presence of the neuromodulators in the neuron vicinity. As shown in table 1, a whole amount of neuromodulators can influence synaptic plasticity at the CA3-CA1 synapse in rodent illustrating the remarkable sensitivity of synapses to their immediate environment.

BOX 1: Metaplasticity or neuromodulation of synaptic plasticity?

As postulated by Abraham in 2008 [64], metaplasticity requires a transient event (called priming) occurring before any synaptic plasticity induction protocol. Metaplasticity occurs when the priming event affects the amplitude, duration, or induction threshold of synaptic plasticity. Priming can be achieved with many different paradigms of stimulation, among those the transient presence of circulating neuropeptides.

On another hand, neuromodulation is defined as a transient modulation of neuronal function that last the time the modulator is present at the vicinity of synapses. There is no long-term effect on synaptic communication. If the modulator is present while inducing synaptic plasticity, it can affect the amplitude, direction or duration of this plasticity. However, it is difficult to evaluate whether a modulator has a priming effect or not when it is still present by the time synaptic plasticity is induced. In fact, several modulators are efficient on synapse function only transiently, even if they are still present, mainly due to their receptor desensitization/internalization and could be considered as primers. In the absence of a clear experiment demonstrating their priming effect, we consider them as neuromodulators by default.

Table1: glutamatergic synaptic communication and plasticity modulation by circulating peptides at CA3-CA1 synapse in rodent (rat, mouse, guinea pig).

	Molecule	**Baseline**	**references**	**LTP**	**references**	**LTD**	**references**
NEUROPEPTIDES	Adrenocorticotropic hormone (ACTH)	no effect	[81]	no effect	[81]	-	-
		increase/facilitation	[81]	decrease/Inhibition	[81]		
	amyloid b-proteins	no effect	[30, 47, 57, 82-87]	no effect	[83, 85]	no effect	[84]
		decrease/Inhibition	[30, 47]	decrease/Inhibition	[47, 57, 82-85, 87-90]	increase/facilitation	[57, 86]
	Angiotensin IV	induction of LTP	[91, 92]	increase/facilitation	[92, 93]	-	-
	Angiotensin 1-7	-	-	increase/facilitation	[94]	-	-

	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	-	-	decrease/Inhibition	[95]	-	-
	Cholecystokinin (CCK)	no effect	[96 , 97]	increase/facilitation	[96 , 97]	-	-
	Galanin	no effect	[98]	decrease/Inhibition	[98]	no effect	[98]
	Ghrelin	induction of LTP	[99]	increase/facilitation	[100]	-	-
	Gonadotropin releasing hormone (GnRH)	induction of LTP	[101 , 102]	-	-	-	-
	Insulin	induction of LTD	[103-105]	-	-	-	-
	Kallikrein-kinin system (Bradykinin)	-	-	-	-	-	-
	Leptin	no effect	[106]	decrease/Inhibition	[106, 107]	-	-
		decrease/Inhibition	[108, 109]				
		induction of LTD	[109, 110]	increase/facilitation	[107]		
		Induction of LTP	[109, 111, 112]				
	Alpha-melanocyte-stimulating hormone (a-MSH)	no effect	[113]	increase/facilitation	[113]	-	-
	Neuropeptide Y (NPY)	decrease/Inhibition	[114]	decrease/Inhibition	[114]	-	-
	Neurotensin	-	-	-	-	-	-
	Opioids	no effect	[115-119]	no effect	[117]	-	-
		decrease/Inhibition	[120]	decrease/Inhibition	[62-64][121]		
		induction of LTP	[122]				
	Oxytocin	no effect	[123, 124]	increase/facilitation	[123, 124]	-	-
	Orexin	induction of LTP	[125]	decrease/Inhibition	[126]	no effect	[126]
		induction of LTD	[125]				
	Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide-38 (PACAP-38)	induction of LTP	[127-130]	decrease/Inhibition	[128]	-	-
		induction of LTD	[128, 130, 131]				
	Somatostatin	-	-	increase/facilitation	[132, 133]	-	-
				no effect	[134]		
	Substance P	increase/facilitation	[135]	increase/facilitation	[135]	-	-
	VGF *(granin family)*	increase/facilitation	[136]	-	-	-	-
	Vasoactive intestinal peptide (VIP)	increase/facilitation	[137]	-	-	decrease/Inhibition	[137]
CYTOKINES	Interferon alpha (IFN-α)	decrease/Inhibition	[138]	decrease/Inhibition	[138, 139]	no effect	[138]

		no effect	[139]				
	Interleukin 1 beta (IL-1β)	decrease/Inhibition	[140-142]	decrease/Inhibition	[140-143]	decrease/ opioids, Inhibition	[140]
		no effect	[142-145]	increase/facilitation	[144]	decrease/Inhibition	[144]
	Interleukin 2 (IL-2)	-	-	decrease/Inhibition	[145]	-	-
	Interleukin 6 (IL-6)	no effect	[146, 147]	decrease/Inhibition	[146, 147]	-	-
	Tumor necrosis factor (TNF-α)	increase/facilitation	[148]	decrease/Inhibition	[148]	-	-
				no effect	[149]		
GROWTH FACTORS	Epidermal growth factor (EGF)	no effect	[150, 151]	increase/facilitation	[150, 151]	-	-
	acidic Fibroblast growth factor (aFGF)	decrease/Inhibition	[152]	increase/facilitation	[152, 153]	-	-
	basic Fibroblast growth factor (bFGF)	no effect	[154]	increase/facilitation	[154]	-	-
	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	induction of LTP	[155, 156]	increase/facilitation	[117, 143, 156-168]	decrease/Inhibition	[168, 169]
		no effect	[157, 158, 166-170]	no effect	[169]	increase/facilitation	[164, 169]
	Growth Hormone (GH)	increase/facilitation	[171, 172]	-	-	-	-
	Insulin-like Growth factor 1 (IGF-1)	increase/facilitation	[171, 173]	-	-	-	-
		induction of LTD	[105]				
	Nerve Growth Factor (NGF)	no effect	[155]	no effect	[167]	-	-
	Neurotrophin 3 (NT3)	induction of LTP	[155]	no effect	[157, 167]	-	-
	Neurotrophin 4/5 (NT4/5)	-	-	increase/facilitation	[167]	-	-
Chemokines	fractalkine (CX3CL1)	decrease/Inhibition	[174]	-	-	-	-

Red = decrease/inhibition, green = increase/facilitation, blue = no effect, - = not study found

Most of the experiments illustrated in this table have been performed by exogenously applying the modulator onto *ex vivo* rodent slices. The effects of circulating peptides have been mainly studied on LTP induction mechanisms at the CA3-CA1 synapse. Some results have been confirmed by the use of specific antagonists to evaluate the role of endogenous peptides like VIP or BDNF, or by receptor (IL-1, TNFR1, TNFR2…) or neuropeptide (SST, VGF, IL-1β…) invalidation in KO mice. As shown in table 1, these molecules have complex, sometimes contradictory effects on synaptic plasticity, depending on their concentration or development stage/age of the model. Indeed, neuromodulation of synaptic plasticity requires the concomitance of several factors: i) presence of the circulating molecule in the

vicinity of synapses, ii) post-synaptic expression of the appropriate receptors, and iii) intracellular signaling pathways to regulate synaptic function [175-182].

Apparent opposite effects of IGF-1, IL-1β, leptin, PACAP, opioids and orexin on synaptic plasticity have been described. For opioids, the effect depends on the nature of the ligand. Nociceptin/Orphanin FQ depress basal synaptic transmission at concentration > 1µM only, whereas acute injection of 3 mg/Kg morphine in vivo induces LTP of synaptic response. Age of the tested animals could also influence the neuromodulation ability of the neuropeptide. Orexin and leptin induce LTP in adult but LTD in juvenile mice. The concentration of the circulating peptide may have an important role as well. Low concentration of PACAP38 (0.05 up to 1 nM) or leptin (1 pM) favors LTP, whereas higher concentrations (PACAP38: 10 nM up to 1 µM; Leptin: 0.1-25 nM) induce LTD or reverse LTP. Low concentrations of IL-1β up to 3 nM inhibit LTP, but high concentrations have a potentiating effect. Both absence of effect or effect is reported for ACTH, BDNF, TNF-α, IL-1β, IFN-α, SRIF or Aβ. The differences in the reported results may arise from dose-dependent effect (BDNF, IFN-α, SRIF, Aβ), but also from the drug administration way (TNF-α pretreatment vs. acute) or the use of different peptide sizes (ACTH, Aβ). Moreover, some of these peptides may have differential effects depending on the neuronal activity state. As an example, cytokines like IL-1β have no effect on glutamatergic transmission if GABAergic transmission is inhibited, whereas they can induce LTD when the inhibitory transmission is maintained. The physiological role of the circulating peptide is then complex but their mode of action suggests a homeostatic role on synaptic plasticity. To be released, most circulating peptides require a high level of neuronal activity or specific process such as inflammation. Due to their concentration dependent effect, these molecules have probably different roles whether there are close to their released site (high concentration) or if they have diffused away from their site of release (low concentration). It is then remarkable that, for example, high concentration of PACAP induces LTD (activity of the releasing site is high) whereas it favors LTP elsewhere where activity should be lower. So far, synergic effect of several neuropeptides (see [178]) on plasticity mechanisms has not been studied even if we can hypothesize it.

3.2 Modulation of synaptic plasticity during AD

3.2.1 Metaplasticity mechanisms alterations during AD.

Interestingly, one of the main clinical outcomes of AD, in addition to memory impairment and cognitive decline, is seizure, and an excessive neuronal hyperexcitability seems to be a hallmark of AD even prior to clinical manifestations of significant memory impairment [183]. This is in agreement

with data reporting that mild AD patients have a high incidence risk for epileptic seizures [184]. Such early hippocampal hyperactivation could be interpreted as a compensatory mechanism for the synaptic depression and the emerging cognitive decline in patients with high genetic risk of AD. However other evidence suggests that this hyperactivation could be primarily pathogenic and may indeed impair learning and memory (see [185]). Alterations of the glutamatergic/GABAergic balance, a homeostatic basis for appropriate information transfer in the brain, can occur in AD with early defect of the inhibitory circuits [186]. Mouse AD models also display an increased aberrant network activity which can be due to an imbalanced excitation/inhibition ratio [46, 187-193], and increased intrinsic excitability properties of CA1 hippocampal neurons [194]. In addition, the Aβo-induced increase in neuronal activity is paralleled with an impairment of hippocampal LTP, and both alterations can be normalized by boosting the GABA tone with anticonvulsant drugs such as levetiracetam or topiramate [195]. These drugs improved learning and memory in both an Aβo-driven AD model [196], and in patients with amnestic mild cognitive impairment presenting substantial brain levels of Aβo [197].

That pathogenic Aβo cause persistent synaptic weakening at specific synapses, while eliciting aberrant excitatory activity at the network level seems rather contradictory. Early hippocampal hyperactivation could be interpreted as primarily pathogenic and may lead to learning and memory impairment. Adjustment of the induction threshold of LTP/LTD by past neuronal activity through metaplasticity/neuromodulation processes can be one of these mechanisms. In line with this hypothesis, a link between AD and homeostatic synaptic plasticity has recently been suggested [192; 193]. In the APP/PS1 mouse model, a developmental form of metaplasticity is impaired [198]. In this study, the LTP/LTD induction thresholds were examined in mice at 1 and 6 months of age. The induction threshold is age-dependently modified to favor LTP and reduce LTD at the hippocampal CA1 synapses in wild-type mice, whereas APP/PS1 transgenic mice fail to undergo this normal developmental metaplasticity. Magnitudes of LTP and LTD in the APP/PS1 transgenic mice remained the same at 1 and 6 months, but when compared to those of age-matched wild-type mice, 6 month-old APP/PS1 mice display LTP reduction and LTD facilitation. The molecular mechanisms underlying this alteration of metaplasticity have been investigated. Because Aβo neurotoxicity causes synaptic depression, synaptic scaling is likely to play a role in maintaining signal strength. A demonstration that Aβo triggers an aberrant over-scaling of homeostatic plasticity has recently been performed by Gilbert et al. [199]. Synaptic scaling is normally induced in the visual cortex by visual deprivation *in vivo*, which leads to synapse silencing and subsequent up-loading of GluAs at the synaptic sites. Acute application of Aβo in this context of neuronal inactivity results in an overshoot of the up-regulation of GluA-mediated synaptic currents and cell-surface GluA expression. Moreover, Aβo enhances the expression of GluA2-lacking calcium permeable GluAs (CP-GluAs), which are required for initiation, but not maintenance of high stimulation protocols. Appearance of synaptic CP-GluA expression and increase

in GluA1 phosphorylation, which enhances calcium permeability of GluAs, are implicated in the altered synaptic plasticity threshold observed in APP/PS1 mice [194]. Excessive synaptic scaling, associated to an increase in calcium influx, could potentially lead to an elevation in the overall network excitability. Since synaptic release of Aβ is stimulated by neuronal activity, increased synaptic activity could create a positive feedback loop that accelerates AD progression. Mechanisms underlying AD-related seizures remain unknown, but synaptic over-scaling may represent a causal factor. In six-month-old AβPP23 transgenic mice (AβPP23tg), which overexpress the human APP carrying the Swedish double mutation, behavioral alterations are associated with inhibition of LTP compared to age-match WT mice. Interestingly, metaplasticity at CA1 synapses in hippocampal slices from AβPP23tg mice is inversed, as a robust LTP could be induced by theta-burst stimulation (TBS) following a 2x10Hz priming stimulus, which does not induce by itself any change in synaptic strength in both groups of mice, but fully occluded the induction of LTP by TBS in WT mice. These data are associated with NMDAR signaling and trafficking alteration, but the susceptibility of the network to hyperactivity in AβPP23tg mice could also be due to a contribution of synaptic scaling enhancement [200]. L-LTP and its associative plasticity mechanisms such as STC, but also cross-capture, the positive associative interaction between LTP and LTD, are impaired in presymptomatic young APP/PS1 mice [201]. Metaplasticity activation via ryanodine receptors (RyR) priming in hippocampal neurons restores L-LTP and STC, and ameliorates the synaptic plasticity deficits via the activation of PKMζ, a critical PRP implicated in the establishment of long-term memory [202]. RyR-mediated metaplastic mechanisms can be considered as a possible therapeutic target for counteracting synaptic impairments in the neuronal networks during the early progression of AD.

3.2.2 Neuromodulation and synaptic plasticity in AD

During AD, many neuropeptides and cytokines expression/secretion systems have been shown to be perturbed. Therefore, any alterations of their neuromodulatory functions could possibly play an important part in the deregulation of synaptic plasticity during AD.

In fact, changes in expression, trafficking and secretion of neuropeptides have been largely described in AD as illustrated by table 2 (see also [203]). Somatostatin, Neuropeptide Y or galanin are the main neuropeptides which secretion is strongly reduced during AD. More generally, the concentration of neuropeptides is perturbed in AD patients and a correlation between neuropeptide concentration and the severity of AD symptoms has been established (reviewed in [204-206]). Changes in the concentration of cytokines, chemokines, prostanoids and complement system are associated with AD pathogenesis [207]. Several mechanisms have been proposed to explain this homeostatic dysregulation.

Table2: examples of circulating peptide system alteration in AD or AD models

	Molecule	Model	Peptide/ receptor	Comments	references
Neuropeptides	ACTH	Human	peptide	No change in plasma concentration	[208]
	Angiotensin	Human	peptide	Decreased plasma level	[209]
			receptor	Increased AT2 receptor recognition site levels in temporal cortex but no other brain areas	[210]
		Murine	peptide	Decreased level in SAMP8 mouse brain	[211]
	CGRP	Human	peptide	Decreased neuritin level in brain	[212]
	CCK	Human	peptide	No difference in CCK level Decreased CCK-like immunoreactivity or increased CCK immunoreactivity when cases where grouped according to post-mortem delay (before or after 22h)	[213-215]
			receptor	No change in CCK receptor binding	[216]
	Galanin	Human	receptor	Increase, increase or no change of Galanin binding site and occupancy is dependant of brain area. Increase of Galanin binding sites in Amygdala in early stage of AD but decrease in late stage.	[217 , 218, 219 , 220] [221]
			peptide	No change in galanin concentration in brain Increased galanin immunoreactivity in some brain areas No change in CSF galanin level increased CSF galanin level	[222] [223-226] [227, 228] [229]
		Murine	receptor	Increase of Galanin receptor activity (3xTg-AD mice) Aβ increase GAL2 but not GAL1 mRNA expression	[230] [231]
			peptide	Aβ increase Galanin	[231]
	Ghrelin	Human	peptide	Reduction mRNA levels for ghrelin and its variants No change in plasma/serum levels of Ghrelin	[232] [233, 234]
			receptor	Reduction for its receptor GHS-R1a while GHS-R1b level is increased in temporal gyrus of AD brain	[232]
	GnRH	Human	peptide	increase in brain circulating GnRH	[235]
		Murine	peptide	Increase of GnRH and GnRH mRNAs in 12 months-old mice but not in 4 months-old ones (tgArcSwe mice).	[236]
	Insulin	Human	peptide	No change in brain insulin Decrease of brain insulin gene expression No change in CSF level of insulin Decrease in CSF level of insulin Increase in CSF level of insulin No change in plasma level	[237] [238, 239] [240] [241] [242] [243]
			receptor	No change in insulin receptor Decrease of insulin receptor gene expression	[244] [238, 239]
	Kallikrein-kinin system (Bradykinin)	Human	peptide	Increase of BK in AD brains	[245]
		Murine	peptide	human $A\beta_{(1-40)}$ induces an increase in BK concentration in rat CSF	[246] *reviewed in* [247]
			receptor	B1 and B2 receptor binding sites are increased after $A\beta_{(1-40)}$ infusion in rats	[248]
	Leptin	Human	peptide	Decreased/not changed level of leptin in serum of AD patients Increase/no change of leptin level in AD patient CSF Shift in the leptin immunoreactivity from hippocampal neurons to astrocyte in AD patients	[249-252] [253, 254] [253]
			receptor	Plasma soluble leptin receptor level is higher in AD patients Decreased leptin receptor level in AD patient hippocampus	[250] [253, 254]
		Murine	peptide	Shift in the leptin immunoreactivity from hippocampal neurons to astrocyte in 2 year TG2576 mice	[253]
			receptor	Decreased leptin receptor level in 2 year TG2576 mice	[253]
	α-MSH	Human	peptide	Decreased/increased/not changed level of α-MSH in brain depending of the brain area Decreased concentration in CSF of late onset of dementia	[255] [256]
		Murine	peptide	Activation of POMC neurons rescued LTP (APP/PS1 mice)	[257]
	NPY	Human	receptor	Decrease of NPY receptors	[258]
			peptide	Decreased or no change NPY immunoreactivity in brain	[259-261] [262-264]

				Increase or no change of NPY concentration depending of the brain area No change in NPY concentration in CSF or plasma Decreased NPY CSF or plasma immunoreactivity	[228, 233, 265, 266] [267-271]
		Murine	peptide	Increased NPY concentration in PDAPP and APP23 models but decreased NPY mRNAs expression and NPY expressing neurons at early stage in Ps1xAPP model	[272-274]
	Neurotensin	Human	peptide	No change or decreased Neurotensin peptide and mRNA levels in amygdala, temporal gyrus region or septum. No difference in Neurotensin CSF level.	[275-281]
	Opioids	Human	receptor	Kappa opioid receptor level is increased in limbic system whereas mu and delta opioid receptor level is decreased in amygdala. Other studied brain areas are unchanged	Reviewed in [282]
			peptide	Increased CSF total opioids content but with a decreased in β-endorphin level Opioid peptide levels are increased in some brain areas whereas unchanged in others, depending of the nature of the peptide studied	Reviewed in [282]
		murine	peptide	Increased Enkephalin level is correlated to cognitive impairments in hAPP transgenic mice	[283]
	Oxytocin	Human	peptide	increase or no change in oxytocin concentration and decrease in CSF levels, but no change in oxytocin cell number	[284-287]
	Orexin-A	Human	peptide	Decrease orexin-A level in brain and CSF of post-mortem AD patients but increase or no change in alive AD patients	[276, 288-291]
			receptor	Decrease of OA receptors and GPR103 (Aβ42 + zinc sulphate AD model)	[292]
	PACAP-38	Human	peptide	PACAP levels are reduced in multiple brain regions and CSF, positively correlated with the advanced stage of AD	[293]
		Murine	peptide	Nasal applications of PACAP in APP[V717I]-transgenic mice reduced mRNA level of AB transporter receptor PACAP gene down-regulated in mouse models (FAD)APP/PS1, (FAD) Tg2576/Ps1 and no-Tg/Ps1	[294] [295]
	Somatostatin	Human	peptide	SRIF is reported to be the most reduced peptide in AD patients within brain or CSF	[214, 260, 264, 286, 296-306]
			receptor	No change in receptor concentration Functional deficit of somatostatin receptors	[307, 308] [309]
		Murine	peptide	Early loss of SRIF-immunopositive neurons and mRNA in the hippocampus (PS1xAPP) Aβ decreases SRIF content in the brain	[272] [310]
	Substance P	Human	peptide	Decrease of SP concentration in AD brains and CSF but increase is also describes in CSF specially for late disease onset AD patient (>65y)	[276, 291, 311-316]
	VGF *(granin family)*	Human	peptide	Reduction in all of the VGF peptides in the parietal cortex of AD brains Decrease of VGF peptides in CSF of AD patients and CSF of post mortem AD patients	[317] [318, 319]
	VIP	Human	peptide	Decrease of VIP expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of female presenile AD patients (< 65y-o)	[320]
		Murine	peptide	3xTg male mice model showed a decrease of VIP expressing cells in SCN	[321]
cytokines	IFN-α	Human	peptide	Increased RNA expression in prefrontal cortex	[322]
			receptor	No change in RNA expression in prefrontal cortex	[322]
		Murine	peptide	Increased RNA expression in cultured neurons pretreated with Aβ(1-42) Increased protein expression in Tg APP/PS1 mouse	[322]
	IFN-γ	Human	peptide	Increased plasma level No change in plasma level	[243] [323]
	Interleukin 1β	Human	peptide	Increased RNA expression in prefrontal cortex Increased plasma level No change in CSF level	[322] [243, 323, 324] [323]
		Murine	peptide	Increased RNA expression in cultured neurons pretreated with Aβ(1-42)	[322]

	Interleukin 2	Human	peptide	Increased plasma level	[243]
	Interleukin 6	Human	peptide	Increased RNA expression in prefrontal cortex Increased plasma level No change in CSF level	[322] [243, 323-325] [323]
		Murine	peptide	Increased RNA expression in cultured neurons pretreated with Aβ(1-42)	[322]
	TNF-α	Human	peptide	Increased plasma level Decreased plasma level No changes in plasma level No change in CSF level	[323, 325-328] [329] [243, 330] [323]
			receptor	Soluble TNF receptor 1 and 2 levels are increased in plasma	[243]
Growth factors	EGF	Human	peptide	decreased plasma level Increased plasma level	[326, 329, 331] [243, 330, 332]
			receptor	Decreased EGFR plasma level	[333]
		Murine	peptide	EGF has protective effect on cognition on AD-Tg model mouse	[334]
	aFGF	Human	peptide	Increased CSF level	[335]
	BDNF	Human	peptide	Decrease expression levels of BNDF mRNA and protein in hippocampus but either decrease or no change in the cortex. Decrease expression levels of BDNF protein in the serum Increased BDNF level in plasma	[336-342] [343]
		Murine	peptide	decrease expression levels of BDNF mRNA (Aβ transgenic strains and 5XFAD transgenic mouse)	[344, 345]
	GH	Human	peptide	No change in GH regulation in mild to moderate AD No difference in AD patients in GH response to GHRH No change in plasma level of GH in AD patients	[346] [347] [348]
	IGF-1	Human	peptide	Increased, decreased or no change in CSF level and plasma level	*reviewed in* [243, 349]
	NGF	Human	peptide	Increased level of proNGF in CSF No change in plasma level Increased NGF protein level in brain	[350] *reviewed in* [351] [343] [339]
	NT3	Human	peptide	Increased or unchanged level in cerebral cortex	[339] *Reviewed in* [352]
	NT4/5	Human	peptide	Increased protein level in brain	[339]
Chemokine	CX3CL1	Murine	peptide	Increased expression in hippocampus	[353] *reviewed in* [354]

When originating from the periphery, molecules have to cross the BBB. As reviewed by Pan and Kastin, most of the circulating neuropeptides, cytokines, growth factor… are able to cross the BBB through saturable transporters [355]. Alteration in the BBB capacity to control the flow of these molecules directly influences their brain tissue and around synapse concentration [356]. Such an alteration has been observed in mild cognitive impairment (MCI) patients, an early phase of AD [357, 358] and is believed to initiate or contribute to AD either by BBB breakdown or by alteration of membrane transporters functioning [356, 359, 360].

Inside the CNS, peptides are released from several sources such as neurons, astrocytes and microglia. Changes in the exocytotic capability of these three cell types during AD directly contribute to the alteration of circulating molecule concentrations and then to the dysregulation of the homeostasis around the synapse.

Impairment of neuronal activity in AD is a feature of the pathology and is directly associated with altered molecule synthesis, trafficking and/or release, thus directly affecting extracellular

circulating molecule concentration like for galanin [361], NPY [205], orexin/hypocretin [362], somatostatin [363] or substance P [276]. Several mechanisms are involved ranging from signaling impairment to specific loss of neuropeptide secreting neurons depending on the stage of the pathology.

Astrocyte activity dysregulation is also observed from early AD stages, inducing early homeostasis impairment [364-366]. Microglia induced reactive astrocytes could be directly involved in AD physiopathology by releasing complement 3 [367]. This astrocyte-dependent release, due to astrocyte exposure to microglial IL-1β, TNF-α and C1q [367], has been shown to modify dendritic morphology and alter synaptic plasticity in neurons [368], and to disturb microglia phagocytosis [369]. Other factors released by astrocytes when exposed to Aβ(1-42) are cytokines, growth factors or cell-adhesion molecules [370], and they all are capable to interfere with synaptic functions [371, 372].

The third main source of circulating molecules is microglia when in its activated state. Activated microglia, such as observed during AD or BBB disruption, release inflammatory molecules [373, 374] including IL-1β, TNFα, IL-6, IFNγ or IL-18 which all modulate synaptic communication and plasticity (see table 1). It also promotes reactive astrocytes, which are believed to be neurotoxic by their ability to upregulate complement cascade [367]. Thus, several studies have found that TNF-α is increased in periphery [243] and post-mortem AD tissue [375], but also in preclinical models of AD [376]. Interestingly, TNF-α can regulate neuronal excitability through an action on GluA trafficking and initiate synaptic scaling. Stellwagen and Malenka have shown that a prolonged decrease in neuronal activity, such as occurring in AD, can result in an increase in the release of glial TNF-α, which, in turn, can act on the neuronal plasma membrane to increase the number of GluAs [149]. This suggests that glia-dependent TNF-α levels can actively participate in the homeostatic activity-dependent regulation of synaptic connectivity during the course of AD. Microglia, through complement system, could also be involved in the early synapse loss in pre-plaque AD brain. In J20 (familial AD-mutant hAPP) transgenic mice or APP/PS1 mice, microglia release abnormal quantity of C1q, a complement protein which then localizes at synapses and mark them for elimination. C1q presence is necessary to observe synaptic loss in AD models and impairment of LTP by Aβo [377] .

Changes in neuropeptide receptors expression have been also observed in AD, and these modifications seem to be related to the progression of the disease. Decrease in NPY receptors density in the cerebral cortex and hippocampus of AD patients is described [258], as well as of somatostatin (sst1-4, but not sst5) receptors in temporal cortex [277] and in frontal cortex (sst1, sst2, sst4, sst5 but increase in sst3) [303]. Moreover, a decrease in galanin receptors density is observed in most AD patient brain areas but the occupancy rate of the receptors is increase in particular in frontal cortex, hypothalamus and probably hippocampus [218]. Several other neuropeptidergic systems are also altered during AD depending on the brain area, as for opioids receptors for example (see table 2).

With such disturbances and consequences regarding the neuropeptide system, a therapeutic strategy would be to restore neuropeptide homeostasis using neuropeptides or neuropeptide receptor ligands. Galanin [231, 378-380], NPY [381, 382] , POMC [257], CGRP [383], Kisspeptin [384], Leptin [385, 386], Substance P [387], Orexin [388], or Neurotensin [389] have been successfully tested on animal models of AD, and these molecules improved learning and memory, synaptic plasticity, neuronal survival and reduced Aβo deleterious effect on brain functions. Strategy based on modulation of inflammation factors like TNF-α seems also promising [376, 390]. However, most clinical tests with neuropeptides have failed in the past. Major problems here, were conflicting reports on the level of neuropeptides and the use of only one molecule. As the multiple and complex actions of neuropeptides on neuronal functions may be differentially disturbed with the evolution of the AD pathology, a discernment of the disease stage of the patients is absolutely needed [203]. At least at the initial AD stages, the modifications of the neuropeptides systems are supposed to be linked to the defense strategy of the brain but are possibly not efficient enough to fight against the evolution of the disease. Finally, it is worth noticing that the peptidergic environment of synapses, known to modulate synaptic plasticity, is altered in AD and that such alteration could underlie an important part of synaptic plasticity dysfunction observed in AD (figure 1).

Figure 1

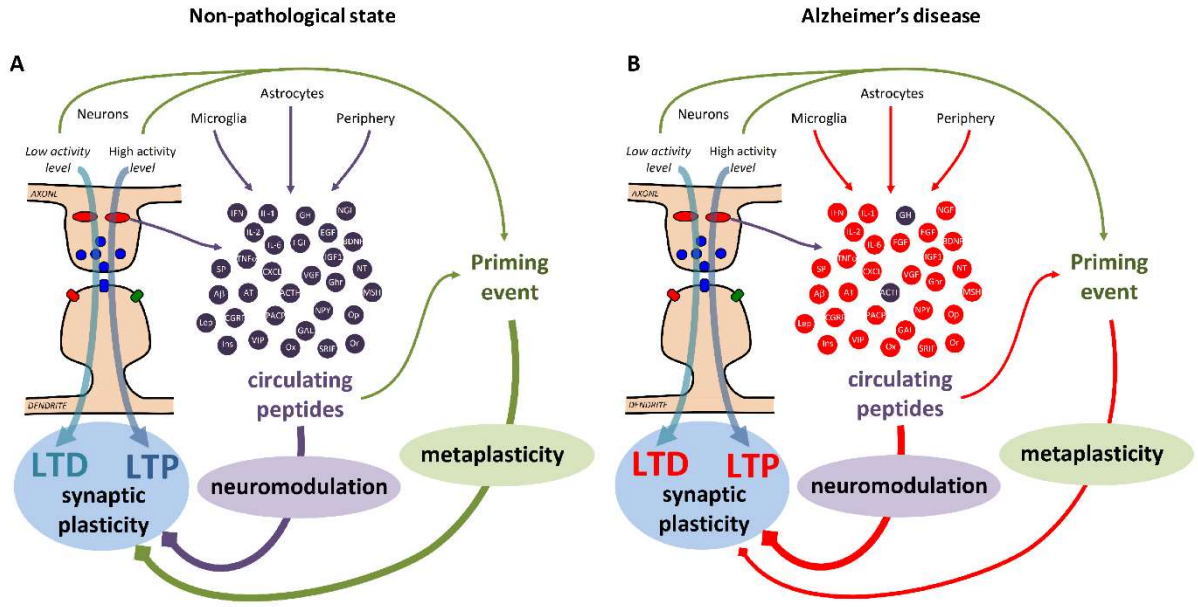


Figure 1:

A) Synaptic plasticity modulation in healthy subjects. Low stimulation of synapses is usually associated with synaptic LTD induction, whereas high activity with LTP. Low or high activity can be priming event for metaplasticity processes by inducing long term modification of the capability of neurons to induce or maintain synaptic plasticity events. High neuronal activity is also associated with release of synaptic

dense core vesicle content (mainly composed of peptides) into the perineuronal environment. Glial (microglia and astrocyte) activity modulates the circulating peptide concentration either par capturing them or by releasing new peptides. The BBB integrity directly contributes to the amount of circulating peptides from peripheral origin by controlling their entry into the brain.

B) Synaptic plasticity modulation is altered in AD. Circulating peptide release or concentration is affected in AD patients or AD murine models except for GH and ACTH peptides, and induction, maintenance or amplitude of the synaptic plasticity events is impacted. Metaplasticity processes are also modified and contribute to the alteration of the capability of neurons to performed LTP and LTD.

Abb. Aβ, Amyloid beta; ACTH, Adrenocorticotropic hormone; AT, Angiotensin; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CGRP, Calcitonin gene-related peptide; CXCL, Fractalkine; EGF, Epidermal growth factor; FGF, Fibroblast growth factor; GAL, Galanin; GH, Growth hormone; Ghr, Ghrelin; IFN, Interferon; IGF1, Insulin-like growth factor 1; IL, Interleukin; Ins, Insulin; Lep, Leptin; MSH, Alpha-melanocyte-stimulating hormone; NGF, Nerve growth factor; NPY, Neuropeptide Y; NT, Neurotrophin; Op, opioids; Or, Orexin; Ox, Oxytocin; PACP, Pituitary adenylate cyclase–activating polypeptide-38; SP, Substance P; SRIF, Somatostatin; TNF, Tumor necrosis factor; VGF, Granin family; VIP, Vasoactive intestinal peptide.

4) CONCLUSION

The knowledge of the full AD etiology is far from being complete, and no cure is yet available for this devastating disease. It is clear today that early interventions at the level of the long presymptomatic stage of AD are needed, and a lot of work is performed in the search for early biomarkers of AD. Recent data highlight a role for compensatory or adaptive efforts to sustain neuronal activity in the early stages of AD. This is consistent with metaplastic changes that may thus fulfill some temporary beneficial functions on synaptic plasticity. However, aberrant metaplasticity may progressively interfere with normal excitatory processes required for learning and memory. In this context, normalizing metaplasticity or neuromodulatory mechanisms, rather than enhancing LTP or reducing LTD, would be an interesting therapeutic strategy to recover or at least protect synaptic function in AD. Excessive synaptic scaling that seems to occur in APP/PS1 mice model to counteract the depressant impact of Aβo on synaptic plasticity is one interesting potential target.

Maintaining an appropriate synaptic plasticity for learning and memory processes through the modulatory action of neuropeptides is another therapeutic hypothesis. Despite the failure of clinical trials using neuropeptides in the past, different new strategies could be tested. So far, the synergistic effect of several neuropeptides on plasticity mechanisms has not been evaluated, and by extension,

no experiment tried a global restoration strategy targeting several neuropeptide systems. To increase the rate of success of future treatments, personalized medicine should be encouraged based on precise measurement of neuropeptides level in each patient. Moreover, improving the delivery to the central nervous system will greatly add to the therapeutic efficiency of neuropeptides. Performing these experiments is a daunting task, but would be necessary to encourage therapeutic combination of drugs to restore, not only one neuropeptidergic system, but several simultaneously to preserve as long as possible a homeostatic synaptic environment.

5) REFERENCES

1. Poo, M.M., et al., *What is memory? The present state of the engram.* BMC Biol, 2016. **14**: p. 40.
2. Bliss, T.V. and G.L. Collingridge, *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.* Nature, 1993. **361**(6407): p. 31-9.
3. Johnston, M.V., *Clinical disorders of brain plasticity.* Brain Dev, 2004. **26**(2): p. 73-80.
4. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.* Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 572-80.
5. Mucke, L., et al., *High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.* J Neurosci, 2000. **20**(11): p. 4050-8.
6. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
7. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease is a synaptic failure.* Science, 2002. **298**(5594): p. 789-91.
8. Ma, T. and E. Klann, *Amyloid beta: linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease.* J Neurochem, 2012. **120 Suppl 1**: p. 140-8.
9. Aisen, P.S., et al., *On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum.* Alzheimers Res Ther, 2017. **9**(1): p. 60.
10. Marchetti, C. and H. Marie, *Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models?* Rev Neurosci, 2011. **22**(4): p. 373-402.
11. Park, P., et al., *NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1633): p. 20130131.
12. Collingridge, G.L., et al., *Long-term depression in the CNS.* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(7): p. 459-73.
13. Bliss, T.V. and T. Lomo, *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.* J Physiol, 1973. **232**(2): p. 331-56.
14. Nicoll, R.A., *A Brief History of Long-Term Potentiation.* Neuron, 2017. **93**(2): p. 281-290.
15. Penn, A.C., et al., *Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors.* Nature, 2017. **549**(7672): p. 384-388.
16. Collingridge, G.L., S.J. Kehl, and H. McLennan, *Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus.* J Physiol, 1983. **334**: p. 33-46.
17. Daw, M.I., et al., *PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses.* Neuron, 2000. **28**(3): p. 873-86.

18. Lee, H.K., et al., *Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity.* Nature, 2000. **405**(6789): p. 955-9.
19. Chow, V.W., et al., *An overview of APP processing enzymes and products.* Neuromolecular Med, 2010. **12**(1): p. 1-12.
20. Mattson, M.P., *Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives.* Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 1081-132.
21. Giuffrida, M.L., et al., *The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology.* Rev Neurosci, 2010. **21**(2): p. 83-93.
22. Lopez-Toledano, M.A. and M.L. Shelanski, *Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells.* J Neurosci, 2004. **24**(23): p. 5439-44.
23. Plant, L.D., et al., *The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons.* J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5531-5.
24. Puzzo, D., L. Privitera, and A. Palmeri, *Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory.* Neurobiol Aging, 2012. **33**(7): p. 1484 e15-24.
25. Puzzo, D. and O. Arancio, *Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?* J Alzheimers Dis, 2013. **33 Suppl 1**: p. S111-20.
26. Puzzo, D., et al., *Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus.* J Neurosci, 2008. **28**(53): p. 14537-45.
27. Puzzo, D., et al., *Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory.* Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 819-30.
28. Garcia-Osta, A. and C.M. Alberini, *Amyloid beta mediates memory formation.* Learn Mem, 2009. **16**(4): p. 267-72.
29. Cirrito, J.R., et al., *Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo.* Neuron, 2008. **58**(1): p. 42-51.
30. Kamenetz, F., et al., *APP processing and synaptic function.* Neuron, 2003. **37**(6): p. 925-37.
31. Cleary, J., et al., *Beta-amyloid(1-40) effects on behavior and memory.* Brain Res, 1995. **682**(1-2): p. 69-74.
32. Cleary, J.P., et al., *Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function.* Nat Neurosci, 2005. **8**(1): p. 79-84.
33. McDonald, M.P., et al., *Effects of an exogenous beta-amyloid peptide on retention for spatial learning.* Behav Neural Biol, 1994. **62**(1): p. 60-7.
34. Stephan, A., S. Laroche, and S. Davis, *Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits.* J Neurosci, 2001. **21**(15): p. 5703-14.
35. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.* Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
36. Nimmrich, V. and U. Ebert, *Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid.* Rev Neurosci, 2009. **20**(1): p. 1-12.
37. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
38. Wang, H.W., et al., *Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus.* Brain Res, 2002. **924**(2): p. 133-40.
39. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.* Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837-42.
40. Lacor, P.N., et al., *Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2007. **27**(4): p. 796-807.
41. Zhang, Y., et al., *Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease.* Neurol Sci, 2016. **37**(7): p. 1039-47.
42. Chapman, P.F., et al., *Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice.* Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 271-6.

43. Hsia, A.Y., et al., *Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3228-33.
44. Walsh, D.M., et al., *Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition.* Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 552-7.
45. Palop, J.J. and L. Mucke, *Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks.* Nat Neurosci, 2010. **13**(7): p. 812-8.
46. Palop, J.J. and L. Mucke, *Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin?* Neuromolecular Med, 2010. **12**(1): p. 48-55.
47. Cullen, W.K., et al., *Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments.* Neuroreport, 1997. **8**(15): p. 3213-7.
48. Hartley, D.M., et al., *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons.* J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8876-84.
49. Chen, G., et al., *A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.* Nature, 2000. **408**(6815): p. 975-9.
50. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo.* Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-9.
51. Klyubin, I., et al., *Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo.* Nat Med, 2005. **11**(5): p. 556-61.
52. Klyubin, I., et al., *Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization.* J Neurosci, 2008. **28**(16): p. 4231-7.
53. Puzzo, D. and O. Arancio, *Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation.* Curr Alzheimer Res, 2006. **3**(3): p. 179-83.
54. Townsend, M., et al., *Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers.* Ann Neurol, 2006. **60**(6): p. 668-76.
55. Knobloch, M., et al., *Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms.* J Neurosci, 2007. **27**(29): p. 7648-53.
56. Wei, W., et al., *Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity.* Nat Neurosci, 2010. **13**(2): p. 190-6.
57. Kim, J.H., et al., *Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo.* J Neurosci, 2001. **21**(4): p. 1327-33.
58. Kervern, M., et al., *Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors.* J Alzheimers Dis, 2012. **32**(1): p. 183-96.
59. Li, S., et al., *Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake.* Neuron, 2009. **62**(6): p. 788-801.
60. Abraham, W.C. and A. Robins, *Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma.* Trends Neurosci, 2005. **28**(2): p. 73-8.
61. Abbott, L.F. and S.B. Nelson, *Synaptic plasticity: taming the beast.* Nat Neurosci, 2000. **3 Suppl**: p. 1178-83.
62. Turrigiano, G.G. and S.B. Nelson, *Hebb and homeostasis in neuronal plasticity.* Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 358-64.
63. Abraham, W.C. and M.F. Bear, *Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity.* Trends Neurosci, 1996. **19**(4): p. 126-30.
64. Abraham, W.C., *Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity.* Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(5): p. 387.
65. Bienenstock, E.L., L.N. Cooper, and P.W. Munro, *Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex.* J Neurosci, 1982. **2**(1): p. 32-48.
66. Hulme, S.R., et al., *Calcium-dependent but action potential-independent BCM-like metaplasticity in the hippocampus.* J Neurosci, 2012. **32**(20): p. 6785-94.

67. Silvestre de Ferron, B., et al., *Two Binges of Ethanol a Day Keep the Memory Away in Adolescent Rats: Key Role for GLUN2B Subunit.* Int J Neuropsychopharmacol, 2015. **19**(1).
68. Muller-Dahlhaus, F. and U. Ziemann, *Metaplasticity in human cortex.* Neuroscientist, 2015. **21**(2): p. 185-202.
69. Alzoubi, K.H., A.M. Aleisa, and K.A. Alkadhi, *The sliding threshold of modification hypothesis: Application to the effect of hypothyroidism or chronic psychosocial stress and nicotine on synaptic plasticity.* Neurosci Lett, 2008. **430**(3): p. 203-6.
70. Turrigiano, G.G., et al., *Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons.* Nature, 1998. **391**(6670): p. 892-6.
71. Ibata, K., Q. Sun, and G.G. Turrigiano, *Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing.* Neuron, 2008. **57**(6): p. 819-26.
72. Goold, C.P. and R.A. Nicoll, *Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression.* Neuron, 2010. **68**(3): p. 512-28.
73. Sweatt, J.D., *Dynamic DNA methylation controls glutamate receptor trafficking and synaptic scaling.* J Neurochem, 2016. **137**(3): p. 312-30.
74. Frey, U. and R.G. Morris, *Synaptic tagging and long-term potentiation.* Nature, 1997. **385**(6616): p. 533-6.
75. Frey, U. and R.G. Morris, *Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation.* Trends Neurosci, 1998. **21**(5): p. 181-8.
76. Frey, U., et al., *Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro.* Brain Res, 1988. **452**(1-2): p. 57-65.
77. Nguyen, P.V., T. Abel, and E.R. Kandel, *Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP.* Science, 1994. **265**(5175): p. 1104-7.
78. Redondo, R.L. and R.G. Morris, *Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis.* Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(1): p. 17-30.
79. Banks, W.A., *Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface.* Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4111-9.
80. Banks, W.A., *Peptides and the blood-brain barrier.* Peptides, 2015. **72**: p. 16-9.
81. Seidenbecher, T., et al., *Neuronal transmission of hippocampal CA1 neurones is modulated by corticotropin-like intermediate lobe peptide [CLIP; ACTH(18-39)].* Peptides, 1993. **14**(6): p. 1221-4.
82. Vitolo, O.V., et al., *Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13217-21.
83. Nomura, I., et al., *Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons.* Neurosci Lett, 2005. **391**(1-2): p. 1-6.
84. Raymond, C.R., D.R. Ireland, and W.C. Abraham, *NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus.* Brain Res, 2003. **968**(2): p. 263-72.
85. Freir, D.B., C. Holscher, and C.E. Herron, *Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo.* J Neurophysiol, 2001. **85**(2): p. 708-13.
86. Cheng, L., et al., *Amyloid beta-protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo.* Synapse, 2009. **63**(3): p. 206-14.
87. Zhang, J.M., et al., *Amyloid beta-protein fragment 31-35 suppresses long-term potentiation in hippocampal CA1 region of rats in vivo.* Synapse, 2006. **60**(4): p. 307-13.
88. Freir, D.B., D.A. Costello, and C.E. Herron, *A beta 25-35-induced depression of long-term potentiation in area CA1 in vivo and in vitro is attenuated by verapamil.* J Neurophysiol, 2003. **89**(6): p. 3061-9.
89. Chen, Q.S., et al., *Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides.* J Neurosci Res, 2000. **60**(1): p. 65-72.

90. Ye, L. and J.T. Qiao, *Suppressive action produced by beta-amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-independent: it's offset by (-)huperzine A.* Neurosci Lett, 1999. **275**(3): p. 187-90.
91. Davis, C.J., et al., *AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation.* Neuroscience, 2006. **137**(4): p. 1369-79.
92. Kramar, E.A., et al., *The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro.* Brain Res, 2001. **897**(1-2): p. 114-21.
93. Chow, L.H., et al., *Angiotensin IV possibly acts through PKMzeta in the hippocampus to regulate cognitive memory in rats.* Neuropeptides, 2015.
94. Hellner, K., et al., *Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas.* Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(3): p. 427-35.
95. Liu, X.D., et al., *Inhibitory effects of calcitonin gene-related peptide on long-term potentiation induced in hippocampal slices of rats.* Neurosci Lett, 2011. **494**(1): p. 10-3.
96. Balschun, D. and K.G. Reymann, *Cholecystokinin (CCK-8S) prolongs 'unsaturated' theta-pulse induced long-term potentiation in rat hippocampal CA1 in vitro.* Neuropeptides, 1994. **26**(6): p. 421-7.
97. Yasui, M. and K. Kawasaki, *CCKB-receptor activation augments the long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices.* Jpn J Pharmacol, 1995. **68**(4): p. 441-7.
98. Coumis, U. and C.H. Davies, *The effects of galanin on long-term synaptic plasticity in the CA1 area of rodent hippocampus.* Neuroscience, 2002. **112**(1): p. 173-82.
99. Cavalier, M., et al., *Involvement of PKA and ERK pathways in ghrelin-induced long-lasting potentiation of excitatory synaptic transmission in the CA1 area of rat hippocampus.* Eur J Neurosci, 2015. **42**(8): p. 2568-76.
100. Ribeiro, L.F., et al., *Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(1): p. E149-58.
101. Lu, F., et al., *Activation of gonadotropin-releasing hormone receptors produces neuronal excitation in the rat hippocampus.* Chin J Physiol, 1999. **42**(2): p. 67-71.
102. Yang, S.N., et al., *Activation of gonadotropin-releasing hormone receptors induces a long-term enhancement of excitatory postsynaptic currents mediated by ionotropic glutamate receptors in the rat hippocampus.* Neurosci Lett, 1999. **260**(1): p. 33-6.
103. Man, H.Y., et al., *Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization.* Neuron, 2000. **25**(3): p. 649-62.
104. Ahmadian, G., et al., *Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD.* Embo J, 2004. **23**(5): p. 1040-50.
105. Huang, C.C., C.C. Lee, and K.S. Hsu, *An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus.* J Neurochem, 2004. **89**(1): p. 217-31.
106. Moult, P.R., B. Milojkovic, and J. Harvey, *Leptin reverses long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses.* J Neurochem, 2009. **108**(3): p. 685-96.
107. Oomura, Y., et al., *Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats.* Peptides, 2006. **27**(11): p. 2738-49.
108. Shanley, L.J., A.J. Irving, and J. Harvey, *Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity.* J Neurosci, 2001. **21**(24): p. RC186.
109. Moult, P.R. and J. Harvey, *NMDA receptor subunit composition determines the polarity of leptin-induced synaptic plasticity.* Neuropharmacology, 2011. **61**(5-6): p. 924-36.
110. Durakoglugil, M., A.J. Irving, and J. Harvey, *Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression.* J Neurochem, 2005. **95**(2): p. 396-405.
111. Luo, X., et al., *Leptin Induces a Novel Form of NMDA Receptor-Dependent LTP at Hippocampal Temporoammonic-CA1 Synapses(1,2,3).* eNeuro, 2015. **2**(3).

112. Moult, P.R., et al., *Leptin regulates AMPA receptor trafficking via PTEN inhibition.* J Neurosci, 2010. **30**(11): p. 4088-101.
113. Shen, Y., et al., *Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism.* J Neurosci, 2013. **33**(2): p. 464-72.
114. Sorensen, A.T., et al., *NPY gene transfer in the hippocampus attenuates synaptic plasticity and learning.* Hippocampus, 2008. **18**(6): p. 564-74.
115. Higgins, G.A., et al., *A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory.* Eur J Neurosci, 2002. **15**(5): p. 911-22.
116. Bongsebandhu-phubhakdi, S. and T. Manabe, *The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation.* J Neurosci, 2007. **27**(18): p. 4850-8.
117. Barco, A., et al., *Gene Expression Profiling of Facilitated L-LTP in VP16-CREB Mice Reveals that BDNF Is Critical for the Maintenance of LTP and Its Synaptic Capture.* Neuron, 2005. **48**(1): p. 123-37.
118. Dong, Z., et al., *Opioid withdrawal for 4 days prevents synaptic depression induced by low dose of morphine or naloxone in rat hippocampal CA1 area in vivo.* Hippocampus, 2009.
119. Dingledine, R., *Possible mechanisms of enkephalin action on hippocampal CA1 pyramidal neurons.* J Neurosci, 1981. **1**(9): p. 1022-35.
120. Yu, T.P., et al., *Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus.* Hippocampus, 1997. **7**(1): p. 88-94.
121. Stringer, J.L., et al., *Blockade of long-term potentiation by phencyclidine and sigma opiates in the hippocampus in vivo and in vitro.* Brain Res, 1983. **280**(1): p. 127-38.
122. Yang, Y., et al., *Stress enables synaptic depression in CA1 synapses by acute and chronic morphine: possible mechanisms for corticosterone on opiate addiction.* J Neurosci, 2004. **24**(10): p. 2412-20.
123. Tomizawa, K., et al., *Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade.* Nat Neurosci, 2003. **6**(4): p. 384-90.
124. Lin, Y.T., C.C. Huang, and K.S. Hsu, *Oxytocin promotes long-term potentiation by enhancing epidermal growth factor receptor-mediated local translation of protein kinase Mzeta.* J Neurosci, 2012. **32**(44): p. 15476-88.
125. Selbach, O., et al., *Orexins/Hypocretins control bistability of hippocampal long-term synaptic plasticity through co-activation of multiple kinases.* Acta Physiol (Oxf), 2009.
126. Aou, S., et al., *Orexin-A (hypocretin-1) impairs Morris water maze performance and CA1-Schaffer collateral long-term potentiation in rats.* Neuroscience, 2003. **119**(4): p. 1221-8.
127. Roberto, M. and M. Brunelli, *PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region.* Learn Mem, 2000. **7**(5): p. 303-11.
128. Roberto, M., R. Scuri, and M. Brunelli, *Differential effects of PACAP-38 on synaptic responses in rat hippocampal CA1 region.* Learn Mem, 2001. **8**(5): p. 265-71.
129. Macdonald, D.S., et al., *Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src.* J Neurosci, 2005. **25**(49): p. 11374-84.
130. Costa, L., et al., *Modulation of AMPA receptor-mediated ion current by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in CA1 pyramidal neurons from rat hippocampus.* Hippocampus, 2009. **19**(1): p. 99-109.
131. Kondo, T., et al., *Differential alteration of hippocampal synaptic strength induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38).* Neurosci Lett, 1997. **221**(2-3): p. 189-92.
132. Fan, W. and T. Fu, *Somatostatin modulates LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons: differential activation conditions in apical and basal dendrites.* Neurosci Lett, 2014. **561**: p. 1-6.

133. Rostampour, M., et al., *The ability of hippocampal CA1 area for induction of long-term potentiation is persistently reduced by prior treatment with cysteamine: an in vitro study.* Neuropeptides, 2002. **36**(4): p. 263-70.
134. Matsuoka, N., S. Kaneko, and M. Satoh, *Somatostatin augments long-term potentiation of the mossy fiber-CA3 system in guinea-pig hippocampal slices.* Brain Res, 1991. **553**(2): p. 188-94.
135. Langosch, J.M., et al., *Effects of substance P and its antagonist L-733060 on long term potentiation in guinea pig hippocampal slices.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(2): p. 315-9.
136. Bozdagi, O., et al., *The neurotrophin-inducible gene Vgf regulates hippocampal function and behavior through a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism.* J Neurosci, 2008. **28**(39): p. 9857-69.
137. Cunha-Reis, D., M. Aidil-Carvalho, and J. Ribeiro, *Endogenous inhibition of hippocampal LTD and depotentiation by vasoactive intestinal peptide VPAC receptors.* Hippocampus, 2014.
138. Mendoza-Fernandez, V., R.D. Andrew, and C. Barajas-Lopez, *Interferon-alpha inhibits long-term potentiation and unmasks a long-term depression in the rat hippocampus.* Brain Res, 2000. **885**(1): p. 14-24.
139. D'Arcangelo, G., et al., *Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus.* Brain Res, 1991. **564**(2): p. 245-8.
140. Ikegaya, Y., et al., *Interleukin-1beta abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission.* Synapse, 2003. **47**(1): p. 54-7.
141. Bellinger, F.P., S. Madamba, and G.R. Siggins, *Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus.* Brain Res, 1993. **628**(1-2): p. 227-34.
142. Ross, F.M., et al., *A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices.* J Neuroimmunol, 2003. **144**(1-2): p. 61-7.
143. Tong, L., et al., *Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1beta via p38 mitogen-activated protein kinase.* J Neurosci, 2012. **32**(49): p. 17714-24.
144. Nistico, R., et al., *Inflammation subverts hippocampal synaptic plasticity in experimental multiple sclerosis.* PLoS ONE, 2013. **8**(1): p. e54666.
145. Tancredi, V., et al., *Interleukin-2 suppresses established long-term potentiation and inhibits its induction in the rat hippocampus.* Brain Res, 1990. **525**(1): p. 149-51.
146. Li, A.J., et al., *Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices.* Brain Res, 1997. **748**(1-2): p. 30-8.
147. Tancredi, V., et al., *The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK.* J Neurochem, 2000. **75**(2): p. 634-43.
148. Tancredi, V., et al., *Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices.* Neurosci Lett, 1992. **146**(2): p. 176-8.
149. Stellwagen, D. and R.C. Malenka, *Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha.* Nature, 2006. **440**(7087): p. 1054-9.
150. Terlau, H. and W. Seifert, *Influence of epidermal growth factor on long-term potentiation in the hippocampal slice.* Brain Res, 1989. **484**(1-2): p. 352-6.
151. Abe, K., F.J. Xie, and H. Saito, *Epidermal growth factor enhances short-term potentiation and facilitates induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices.* Brain Res, 1991. **547**(1): p. 171-4.
152. Sasaki, K., et al., *Acidic fibroblast growth factor facilitates generation of long-term potentiation in rat hippocampal slices.* Brain Res Bull, 1994. **33**(5): p. 505-11.
153. Sasaki, K., et al., *An amino-terminal fragment peptide of acidic fibroblast growth factor modulates synaptic transmission in rat hippocampal slices.* Brain Res Bull, 1995. **38**(2): p. 185-91.
154. Terlau, H. and W. Seifert, *Fibroblast Growth Factor Enhances Long-term Potentiation in the Hippocampal Slice.* Eur J Neurosci, 1990. **2**(11): p. 973-977.

155. Kang, H.J. and E.M. Schuman, *Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus.* J Physiol Paris, 1995. **89**(1): p. 11-22.
156. Kang, H., et al., *Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation.* Neuron, 1997. **19**(3): p. 653-64.
157. Chen, G., et al., *Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation.* J Neurosci, 1999. **19**(18): p. 7983-90.
158. Rex, C.S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus.* J Neurosci, 2007. **27**(11): p. 3017-29.
159. Korte, M., et al., *Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8856-60.
160. Korte, M., et al., *Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12547-52.
161. Patterson, S.L., et al., *Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice.* Neuron, 1996. **16**(6): p. 1137-45.
162. Xu, B., et al., *The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB.* J Neurosci, 2000. **20**(18): p. 6888-97.
163. Kossel, A.H., et al., *A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14702-7.
164. Ninan, I., et al., *The BDNF Val66Met polymorphism impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the hippocampus.* J Neurosci, 2010. **30**(26): p. 8866-70.
165. Zakharenko, S.S., et al., *Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses.* Neuron, 2003. **39**(6): p. 975-90.
166. Kramar, E.A., et al., *A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor.* J Neurosci, 2004. **24**(22): p. 5151-61.
167. Figurov, A., et al., *Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus.* Nature, 1996. **381**(6584): p. 706-9.
168. Ikegaya, Y., Y. Ishizaka, and N. Matsuki, *BDNF attenuates hippocampal LTD via activation of phospholipase C: implications for a vertical shift in the frequency-response curve of synaptic plasticity.* Eur J Neurosci, 2002. **16**(1): p. 145-8.
169. Woo, N.H., et al., *Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression.* Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 1069-77.
170. Gottschalk, W., et al., *Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus.* J Neurosci, 1998. **18**(17): p. 6830-9.
171. Molina, D.P., et al., *Growth hormone and insulin-like growth factor-I alter hippocampal excitatory synaptic transmission in young and old rats.* Age (Dordr), 2013. **35**(5): p. 1575-87.
172. Mahmoud, G.S. and L.M. Grover, *Growth hormone enhances excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus.* J Neurophysiol, 2006. **95**(5): p. 2962-74.
173. Ramsey, M.M., et al., *Functional characterization of des-IGF-1 action at excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus.* J Neurophysiol, 2005. **94**(1): p. 247-54.
174. Bertollini, C., et al., *Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices.* Neuropharmacology, 2006. **51**(4): p. 816-21.
175. Agnati, L.F., et al., *Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission.* Neuroscience, 1995. **69**(3): p. 711-26.
176. Zoli, M. and L.F. Agnati, *Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses.* Prog Neurobiol, 1996. **49**(4): p. 363-80.
177. Brezina, V., *Beyond the wiring diagram: signalling through complex neuromodulator networks.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1551): p. 2363-74.
178. van den Pol, A.N., *Neuropeptide transmission in brain circuits.* Neuron, 2012. **76**(1): p. 98-115.

179. Nusbaum, M.P. and D.M. Blitz, *Neuropeptide modulation of microcircuits.* Curr Opin Neurobiol, 2012. **22**(4): p. 592-601.
180. Hirase, H., et al., *Volume transmission signalling via astrocytes.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1654): p. 20130604.
181. Vaaga, C.E., M. Borisovska, and G.L. Westbrook, *Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission.* Curr Opin Neurobiol, 2014. **29**: p. 25-32.
182. Nusbaum, M.P., D.M. Blitz, and E. Marder, *Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission.* Nat Rev Neurosci, 2017. **18**(7): p. 389-403.
183. Sperling, R.A., et al., *Functional alterations in memory networks in early Alzheimer's disease.* Neuromolecular Med, 2010. **12**(1): p. 27-43.
184. Amatniek, J.C., et al., *Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease.* Epilepsia, 2006. **47**(5): p. 867-72.
185. Palop, J.J. and L. Mucke, *Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease.* Nat Rev Neurosci, 2016. **17**(12): p. 777-792.
186. Villette, V. and P. Dutar, *GABAergic Microcircuits in Alzheimer's Disease Models.* Curr Alzheimer Res, 2017. **14**(1): p. 30-39.
187. Palop, J.J. and L. Mucke, *Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2009. **66**(4): p. 435-40.
188. Hazra, A., et al., *Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64318.
189. Hazra, A., et al., *Corticothalamic network dysfunction and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2016. **44**: p. 96-107.
190. Oyelami, T., et al., *Age-dependent concomitant changes in synaptic dysfunction and GABAergic pathway in the APP/PS1 mouse model.* Acta Neurobiol Exp (Wars), 2016. **76**(4): p. 282-293.
191. Busche, M.A. and A. Konnerth, *Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1700).
192. Westmark, C.J., P.R. Westmark, and J.S. Malter, *Alzheimer's disease and Down syndrome rodent models exhibit audiogenic seizures.* J Alzheimers Dis, 2010. **20**(4): p. 1009-13.
193. Stargardt, A., D.F. Swaab, and K. Bossers, *Storm before the quiet: neuronal hyperactivity and Abeta in the presymptomatic stages of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2015. **36**(1): p. 1-11.
194. Tamagnini, F., et al., *Altered intrinsic excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons in aged PDAPP mice.* Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 372.
195. Lei, M., et al., *Soluble Abeta oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance.* Neurobiol Dis, 2016. **85**: p. 111-121.
196. Sanchez, P.E., et al., *Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(42): p. E2895-903.
197. Bakker, A., et al., *Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnestic mild cognitive impairment.* Neuron, 2012. **74**(3): p. 467-74.
198. Megill, A., et al., *Defective Age-Dependent Metaplasticity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.* J Neurosci, 2015. **35**(32): p. 11346-57.
199. Gilbert, J., et al., *beta-Amyloid triggers aberrant over-scaling of homeostatic synaptic plasticity.* Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**(1): p. 131.
200. Balducci, C., et al., *Cognitive deficits associated with alteration of synaptic metaplasticity precede plaque deposition in AbetaPP23 transgenic mice.* J Alzheimers Dis, 2010. **21**(4): p. 1367-81.
201. Li, Q., et al., *Metaplasticity mechanisms restore plasticity and associativity in an animal model of Alzheimer's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017.
202. Hsieh, C., et al., *Persistent increased PKMzeta in long-term and remote spatial memory.* Neurobiol Learn Mem, 2017. **138**: p. 135-144.

203. Van Dam, D., et al., *Neuropeptides in Alzheimer's disease: from pathophysiological mechanisms to therapeutic opportunities.* Curr Alzheimer Res, 2013. **10**(5): p. 449-68.
204. Strac, D.S., D. Muck-Seler, and N. Pivac, *Neurotransmitter measures in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review.* Psychiatr Danub, 2015. **27**(1): p. 14-24.
205. Duarte-Neves, J., L. Pereira de Almeida, and C. Cavadas, *Neuropeptide Y (NPY) as a therapeutic target for neurodegenerative diseases.* Neurobiol Dis, 2016. **95**: p. 210-24.
206. Fang, P., et al., *Regulatory effects of galanin system on development of several age-related chronic diseases.* Exp Gerontol, 2017. **95**: p. 88-97.
207. Heneka, M.T., et al., *Neuroinflammation in Alzheimer's disease.* Lancet Neurol, 2015. **14**(4): p. 388-405.
208. Franceschi, M., et al., *ACTH and cortisol secretion in patients with Alzheimer's disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(9): p. 836-7.
209. Jiang, T., et al., *Plasma Angiotensin-(1-7) is a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease.* Curr Neurovasc Res, 2016. **13**(2): p. 96-9.
210. Ge, J. and N.M. Barnes, *Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders.* Eur J Pharmacol, 1996. **297**(3): p. 299-306.
211. Jiang, T., et al., *Angiotensin-(1-7) is Reduced and Inversely Correlates with Tau Hyperphosphorylation in Animal Models of Alzheimer's Disease.* Mol Neurobiol, 2016. **53**(4): p. 2489-97.
212. Choi, Y., et al., *Neuritin attenuates cognitive function impairments in tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104121.
213. Perry, R.H., et al., *Neuropeptides in Alzheimer's disease, depression and schizophrenia. A post mortem analysis of vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin in cerebral cortex.* J Neurol Sci, 1981. **51**(3): p. 465-72.
214. Mazurek, M.F. and M.F. Beal, *Cholecystokinin and somatostatin in Alzheimer's disease postmortem cerebral cortex.* Neurology, 1991. **41**(5): p. 716-9.
215. Lofberg, C., et al., *Cholecystokinin peptides and receptor binding in Alzheimer's disease.* J Neural Transm (Vienna), 1996. **103**(7): p. 851-60.
216. Hays, S.E. and S.M. Paul, *CCK receptors and human neurological disease.* Life Sci, 1982. **31**(4): p. 319-22.
217. Rodriguez-Puertas, R., et al., *125I-galanin binding sites in Alzheimer's disease: increases in hippocampal subfields and a decrease in the caudate nucleus.* J Neurochem, 1997. **68**(3): p. 1106-13.
218. McMillan, P.J., et al., *Increased galanin receptor occupancy in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2004. **25**(10): p. 1309-14.
219. Ikeda, M., D. Dewar, and J. McCulloch, *Preservation of [125I]galanin binding sites despite loss of cholinergic neurones to the hippocampus in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1991. **568**(1-2): p. 303-6.
220. Ikeda, M., D. Dewar, and J. McCulloch, *Galanin receptor binding sites in the temporal and occipital cortex are minimally affected in Alzheimer's disease.* Neurosci Lett, 1995. **192**(1): p. 37-40.
221. Perez, S., et al., *Galanin receptor over-expression within the amygdala in early Alzheimer's disease: an in vitro autoradiographic analysis.* J Chem Neuroanat, 2002. **24**(2): p. 109-16.
222. Beal, M.F., et al., *Galanin-like immunoreactivity is unchanged in Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia cerebral cortex.* J Neurochem, 1988. **51**(6): p. 1935-41.
223. Wallin, A., et al., *Hypothalamic monoamines and neuropeptides in dementia.* Eur Neuropsychopharmacol, 1991. **1**(2): p. 165-8.
224. Minami, M., et al., *A disorganized increase of galanin-like immunoreactivity in cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brains.* J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1991. **3**(4): p. 285-92.

225. Beal, M.F., U. MacGarvey, and K.J. Swartz, *Galanin immunoreactivity is increased in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease.* Ann Neurol, 1990. **28**(2): p. 157-61.
226. Gabriel, S.M., et al., *Galanin-like immunoreactivity is increased in the postmortem cerebral cortex from patients with Alzheimer's disease.* J Neurochem, 1994. **62**(4): p. 1516-23.
227. Berrettini, W.H., et al., *Galanin immunoreactivity in human CSF: studies in eating disorders and Alzheimer's disease.* Neuropsychobiology, 1988. **19**(2): p. 64-8.
228. Sunderland, T., et al., *Reduced cerebrospinal fluid dynorphin A1-8 in Alzheimer's disease.* Biol Psychiatry, 1991. **30**(1): p. 81-7.
229. Costa, A., et al., *Galanin and alpha-MSH autoantibodies in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease.* J Neuroimmunol, 2011. **240-241**: p. 114-20.
230. Manuel, I., et al., *Activity of muscarinic, galanin and cannabinoid receptors in the prodromal and advanced stages in the triple transgenic mice model of Alzheimer's disease.* Neuroscience, 2016. **329**: p. 284-93.
231. Li, L., L. Yu, and Q. Kong, *Exogenous galanin attenuates spatial memory impairment and decreases hippocampal beta-amyloid levels in rat model of Alzheimer's disease.* Int J Neurosci, 2013. **123**(11): p. 759-65.
232. Gahete, M.D., et al., *Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients.* J Alzheimers Dis, 2010. **22**(3): p. 819-28.
233. Proto, C., et al., *Plasma levels of neuropeptides in Alzheimer's disease.* Gynecol Endocrinol, 2006. **22**(4): p. 213-8.
234. Theodoropoulou, A., et al., *Ghrelin and leptin secretion in patients with moderate Alzheimer's disease.* J Nutr Health Aging, 2012. **16**(5): p. 472-7.
235. Bowen, R.L., J.P. Isley, and R.L. Atkinson, *An association of elevated serum gonadotropin concentrations and Alzheimer disease?* J Neuroendocrinol, 2000. **12**(4): p. 351-4.
236. Nuruddin, S., et al., *Elevated mRNA-levels of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in plaque-bearing Alzheimer's disease transgenic mice.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103607.
237. Frolich, L., et al., *Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease.* J Neural Transm (Vienna), 1998. **105**(4-5): p. 423-38.
238. Rivera, E.J., et al., *Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine.* J Alzheimers Dis, 2005. **8**(3): p. 247-68.
239. Steen, E., et al., *Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?* J Alzheimers Dis, 2005. **7**(1): p. 63-80.
240. Molina, J.A., et al., *Cerebrospinal fluid levels of insulin in patients with Alzheimer's disease.* Acta Neurol Scand, 2002. **106**(6): p. 347-50.
241. Gil-Bea, F.J., et al., *Insulin levels are decreased in the cerebrospinal fluid of women with prodomal Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2010. **22**(2): p. 405-13.
242. Fujisawa, Y., K. Sasaki, and K. Akiyama, *Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type.* Biol Psychiatry, 1991. **30**(12): p. 1219-28.
243. Lai, K.S.P., et al., *Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2017.
244. Talbot, K., et al., *Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline.* J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1316-38.
245. Ashby, E.L., S. Love, and P.G. Kehoe, *Assessment of activation of the plasma kallikrein-kinin system in frontal and temporal cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia.* Neurobiol Aging, 2012. **33**(7): p. 1345-55.
246. Iores-Marcal, L.M., et al., *Bradykinin release and inactivation in brain of rats submitted to an experimental model of Alzheimer's disease.* Peptides, 2006. **27**(12): p. 3363-9.

247. Viel, T.A. and H.S. Buck, *Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease in vivo.* Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(1): p. 59-66.
248. Viel, T.A., et al., *Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats.* Neurobiol Aging, 2008. **29**(12): p. 1805-14.
249. Power, D.A., et al., *Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer's disease patients.* Dement Geriatr Cogn Disord, 2001. **12**(2): p. 167-70.
250. Baranowska-Bik, A., et al., *Plasma leptin levels and free leptin index in women with Alzheimer's disease.* Neuropeptides, 2015. **52**: p. 73-8.
251. Teunissen, C.E., et al., *Serum leptin is not altered nor related to cognitive decline in Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2015. **44**(3): p. 809-13.
252. Oania, R. and L.K. McEvoy, *Plasma leptin levels are not predictive of dementia in patients with mild cognitive impairment.* Age Ageing, 2015. **44**(1): p. 53-8.
253. Maioli, S., et al., *Alterations in brain leptin signalling in spite of unchanged CSF leptin levels in Alzheimer's disease.* Aging Cell, 2015. **14**(1): p. 122-9.
254. Bonda, D.J., et al., *Dysregulation of leptin signaling in Alzheimer disease: evidence for neuronal leptin resistance.* J Neurochem, 2014. **128**(1): p. 162-72.
255. Arai, H., et al., *Extrahypophyseal distribution of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-like immunoreactivity in postmortem brains from normal subjects and Alzheimer-type dementia patients.* Brain Res, 1986. **377**(2): p. 305-10.
256. Rainero, I., et al., *CSF alpha-MSH in dementia of the Alzheimer type.* Neurology, 1988. **38**(8): p. 1281-4.
257. Shen, Y., et al., *Stimulation of the Hippocampal POMC/MC4R Circuit Alleviates Synaptic Plasticity Impairment in an Alzheimer's Disease Model.* Cell Rep, 2016. **17**(7): p. 1819-1831.
258. Martel, J.C., et al., *Neuropeptide Y receptor binding sites in human brain. Possible alteration in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1990. **519**(1-2): p. 228-35.
259. Davies, C.A., et al., *A quantitative assessment of somatostatin-like and neuropeptide Y-like immunostained cells in the frontal and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease.* J Neurol Sci, 1990. **96**(1): p. 59-73.
260. Beal, M.F., et al., *Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease.* Ann Neurol, 1986. **20**(3): p. 282-8.
261. Chan-Palay, V., et al., *Distribution of altered hippocampal neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in Alzheimer's-type dementia.* J Comp Neurol, 1986. **248**(3): p. 376-94.
262. Allen, J.M., et al., *Elevation of neuropeptide Y (NPY) in substantia innominata in Alzheimer's type dementia.* J Neurol Sci, 1984. **64**(3): p. 325-31.
263. Gabriel, S.M., et al., *Neuropeptide deficits in schizophrenia vs. Alzheimer's disease cerebral cortex.* Biol Psychiatry, 1996. **39**(2): p. 82-91.
264. Dawbarn, D., et al., *Decreased somatostatin immunoreactivity but not neuropeptide Y immunoreactivity in cerebral cortex in senile dementia of Alzheimer type.* Neurosci Lett, 1986. **70**(1): p. 154-9.
265. Heilig, M., et al., *Cerebrospinal fluid neuropeptides in Alzheimer's disease and vascular dementia.* Biol Psychiatry, 1995. **38**(4): p. 210-6.
266. Atack, J.R., et al., *Cerebrospinal fluid somatostatin and neuropeptide Y. Concentrations in aging and in dementia of the Alzheimer type with and without extrapyramidal signs.* Arch Neurol, 1988. **45**(3): p. 269-74.
267. Martignoni, E., et al., *Cerebrospinal fluid norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and neuropeptide Y levels in Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia of the Alzheimer type.* J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1992. **4**(3): p. 191-205.
268. Edvinsson, L., et al., *Neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and dementia with frontotemporal lobe degeneration.* Dementia, 1993. **4**(3-4): p. 167-71.
269. Koide, S., et al., *Plasma neuropeptide Y is reduced in patients with Alzheimer's disease.* Neurosci Lett, 1995. **198**(2): p. 149-51.

270. Alom, J., et al., *Cerebrospinal fluid neuropeptide Y in Alzheimer's disease.* Eur Neurol, 1990. **30**(4): p. 207-10.
271. Minthon, L., et al., *Neuropeptide levels in Alzheimer's disease and dementia with frontotemporal degeneration.* J Neural Transm Suppl, 1990. **30**: p. 57-67.
272. Ramos, B., et al., *Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(11): p. 1658-72.
273. Diez, M., et al., *Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing beta-amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23).* Neurobiol Dis, 2003. **14**(3): p. 579-94.
274. Diez, M., et al., *Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein--initial observations.* Neuroscience, 2000. **100**(2): p. 259-86.
275. Benzing, W.C., et al., *Reduction of neurotensin immunoreactivity in the amygdala in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1990. **537**(1-2): p. 298-302.
276. Johansson, P., et al., *Cerebrospinal fluid substance P concentrations are elevated in patients with Alzheimer's disease.* Neurosci Lett, 2015. **609**: p. 58-62.
277. Gahete, M.D., et al., *Expression of Somatostatin, cortistatin, and their receptors, as well as dopamine receptors, but not of neprilysin, are reduced in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients.* J Alzheimers Dis, 2010. **20**(2): p. 465-75.
278. Nemeroff, C.B., et al., *Neuropeptides in Alzheimer's disease: a postmortem study.* Regul Pept, 1989. **25**(1): p. 123-30.
279. Biggins, J.A., et al., *Post mortem levels of thyrotropin-releasing hormone and neurotensin in the amygdala in Alzheimer's disease, schizophrenia and depression.* J Neurol Sci, 1983. **58**(1): p. 117-22.
280. Ferrier, I.N., et al., *Neuropeptides in Alzheimer type dementia.* J Neurol Sci, 1983. **62**(1-3): p. 159-70.
281. Emson, P.C., et al., *Neurotensin in human brain: regional distribution and effects of neurological illness.* Brain Res, 1985. **347**(2): p. 239-44.
282. Cai, Z. and A. Ratka, *Opioid system and Alzheimer's disease.* Neuromolecular Med, 2012. **14**(2): p. 91-111.
283. Meilandt, W.J., et al., *Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2008. **28**(19): p. 5007-17.
284. Meynen, G., et al., *Hypothalamic vasopressin and oxytocin mRNA expression in relation to depressive state in Alzheimer's disease: a difference with major depressive disorder.* J Neuroendocrinol, 2009. **21**(8): p. 722-9.
285. Mazurek, M.F., et al., *Oxytocin in Alzheimer's disease: postmortem brain levels.* Neurology, 1987. **37**(6): p. 1001-3.
286. Raskind, M.A., et al., *Cerebrospinal fluid vasopressin, oxytocin, somatostatin, and beta-endorphin in Alzheimer's disease.* Arch Gen Psychiatry, 1986. **43**(4): p. 382-8.
287. Wierda, M., et al., *Oxytocin cell number in the human paraventricular nucleus remains constant with aging and in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 1991. **12**(5): p. 511-6.
288. Schmidt, F.M., et al., *Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (MCH) and hypocretin-1 (HCRT-1, orexin-A) in Alzheimer's disease.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63136.
289. Liguori, C., et al., *Orexinergic system dysregulation, sleep impairment, and cognitive decline in Alzheimer disease.* JAMA Neurol, 2014. **71**(12): p. 1498-505.
290. Fronczek, R., et al., *Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2012. **33**(8): p. 1642-50.
291. Rosler, N., I. Wichart, and K.A. Jellinger, *Clinical significance of neurobiochemical profiles in the lumbar cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients.* J Neural Transm (Vienna), 2001. **108**(2): p. 231-46.

292. Davies, J., et al., *Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 12584.
293. Han, P., et al., *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease.* Neurology, 2014. **82**(19): p. 1724-8.
294. Rat, D., et al., *Neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) slows down Alzheimer's disease-like pathology in amyloid precursor protein-transgenic mice.* FASEB J, 2011. **25**(9): p. 3208-18.
295. Wu, Z.L., et al., *Comparative analysis of cortical gene expression in mouse models of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(3): p. 377-86.
296. Sunderland, T., et al., *CSF somatostatin in patients with Alzheimer's disease, older depressed patients, and age-matched control subjects.* Am J Psychiatry, 1987. **144**(10): p. 1313-6.
297. Gomez, S., et al., *Somatostatin-like immunoreactivity and acetylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease and senile dementia of the Alzheimer type.* Psychoneuroendocrinology, 1986. **11**(1): p. 69-73.
298. Bissette, G., et al., *Regional Neuropeptide Pathology in Alzheimer's Disease: Corticotropin-Releasing Factor and Somatostatin.* J Alzheimers Dis, 1998. **1**(2): p. 91-105.
299. Molchan, S.E., et al., *CSF somatostatin in Alzheimer's disease and major depression: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and clinical measures.* Psychoneuroendocrinology, 1993. **18**(7): p. 509-19.
300. Davis, K.L., et al., *CSF somatostatin in Alzheimer's disease, depressed patients, and control subjects.* Biol Psychiatry, 1988. **24**(6): p. 710-2.
301. Davies, P., R. Katzman, and R.D. Terry, *Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementa.* Nature, 1980. **288**(5788): p. 279-80.
302. Nilsson, C.L., et al., *Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia.* Peptides, 2001. **22**(12): p. 2105-12.
303. Kumar, U., *Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis.* Neuroscience, 2005. **134**(2): p. 525-38.
304. Serby, M., et al., *CSF somatostatin in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 1984. **5**(3): p. 187-9.
305. Reinikainen, K.J., et al., *Decreased somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1987. **402**(1): p. 103-8.
306. Soininen, H.S., et al., *Reduced cholinesterase activity and somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type.* J Neurol Sci, 1984. **63**(2): p. 167-72.
307. Whitford, C., et al., *Cortical somatostatinergic system not affected in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* J Neurol Sci, 1988. **86**(1): p. 13-8.
308. Beal, M.F., et al., *Reduced numbers of somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease.* Science, 1985. **229**(4710): p. 289-91.
309. Cowburn, R.F., et al., *Somatostatin receptors and the modulation of adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(8): p. 748-9.
310. Burgos-Ramos, E., et al., *Chronic but not acute intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide(25-35) decreases somatostatin content, adenylate cyclase activity, somatostatin-induced inhibition of adenylate cyclase activity, and adenylate cyclase I levels in the rat hippocampus.* J Neurosci Res, 2007. **85**(2): p. 433-42.
311. Cramer, H., et al., *Somatostatin-like immunoreactivity and substance-P-like immunoreactivity in the CSF of patients with senile dementia of Alzheimer type, multi-infarct syndrome and communicating hydrocephalus.* J Neurol, 1985. **232**(6): p. 346-51.
312. Martinez, M., A. Frank, and A. Hernanz, *Relationship of interleukin-1 beta and beta 2-microglobulin with neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the Alzheimer type.* J Neuroimmunol, 1993. **48**(2): p. 235-40.

313. Quigley, B.J., Jr. and N.W. Kowall, *Substance P-like immunoreactive neurons are depleted in Alzheimer's disease cerebral cortex.* Neuroscience, 1991. **41**(1): p. 41-60.
314. Beal, M.F. and M.F. Mazurek, *Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex.* Neurology, 1987. **37**(7): p. 1205-9.
315. Waters, S.M. and T.P. Davis, *Alterations of peptide metabolism and neuropeptidase activity in senile dementia of the Alzheimer's type.* Ann N Y Acad Sci, 1997. **814**: p. 30-9.
316. Crystal, H.A. and P. Davies, *Cortical substance P-like immunoreactivity in cases of Alzheimer's disease and senile dementia of the Alzheimer type.* J Neurochem, 1982. **38**(6): p. 1781-4.
317. Cocco, C., et al., *Distribution of VGF peptides in the human cortex and their selective changes in Parkinson's and Alzheimer's diseases.* J Anat, 2010. **217**(6): p. 683-93.
318. Carrette, O., et al., *A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease.* Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1486-94.
319. Wijte, D., et al., *A novel peptidomics approach to detect markers of Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid.* Methods, 2012. **56**(4): p. 500-7.
320. Zhou, J.N., M.A. Hofman, and D.F. Swaab, *VIP neurons in the human SCN in relation to sex, age, and Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 1995. **16**(4): p. 571-6.
321. Sterniczuk, R., et al., *Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes.* Brain Res, 2010. **1348**: p. 139-48.
322. Taylor, J.M., et al., *Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2014. **35**(5): p. 1012-23.
323. Swardfager, W., et al., *A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease.* Biol Psychiatry, 2010. **68**(10): p. 930-41.
324. Dursun, E., et al., *The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease.* J Neuroimmunol, 2015. **283**: p. 50-7.
325. Holmes, C., et al., *Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease.* Neurology, 2011. **77**(3): p. 212-8.
326. Komurcu, H.F., et al., *Plasma levels of vitamin B12, epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha in patients with alzheimer dementia* Int J Res Med Sci., 2016. **4**(3): p. 734-738.
327. Gezen-Ak, D., et al., *BDNF, TNFalpha, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment.* J Alzheimers Dis, 2013. **37**(1): p. 185-95.
328. Holmes, C., et al., *Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease.* Neurology, 2009. **73**(10): p. 768-74.
329. Ray, S., et al., *Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins.* Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1359-62.
330. Marksteiner, J., et al., *Five out of 16 plasma signaling proteins are enhanced in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2011. **32**(3): p. 539-40.
331. Lim, N.S., et al., *Plasma EGF and cognitive decline in Parkinson's disease and Alzheimer's disease.* Ann Clin Transl Neurol, 2016. **3**(5): p. 346-55.
332. Bjorkqvist, M., et al., *Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease.* PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29868.
333. Doecke, J.D., et al., *Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2012. **69**(10): p. 1318-25.
334. Thomas, R., et al., *Epidermal growth factor prevents APOE4 and amyloid-beta-induced cognitive and cerebrovascular deficits in female mice.* Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**(1): p. 111.
335. Mashayekhi, F., et al., *Increased acidic fibroblast growth factor concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease.* J Clin Neurosci, 2010. **17**(3): p. 357-9.

336. Laske, C., et al., *BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls.* J Psychiatr Res, 2007. **41**(5): p. 387-94.
337. Hock, C., et al., *Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease.* Neurosci Lett, 1998. **241**(2-3): p. 151-4.
338. Narisawa-Saito, M., et al., *Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease.* Neuroreport, 1996. **7**(18): p. 2925-8.
339. Hock, C., et al., *Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas.* Arch Neurol, 2000. **57**(6): p. 846-51.
340. Holsinger, R.M., et al., *Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease.* Brain Res Mol Brain Res, 2000. **76**(2): p. 347-54.
341. Connor, B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease.* Brain Res Mol Brain Res, 1997. **49**(1-2): p. 71-81.
342. Phillips, H.S., et al., *BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease.* Neuron, 1991. **7**(5): p. 695-702.
343. Faria, M.C., et al., *Increased plasma levels of BDNF and inflammatory markers in Alzheimer's disease.* J Psychiatr Res, 2014. **53**: p. 166-72.
344. Devi, L. and M. Ohno, *7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease.* Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(2): p. 434-44.
345. Peng, S., et al., *Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2009. **29**(29): p. 9321-9.
346. Heuser, I.J., et al., *Growth hormone secretion in Alzheimer's disease: 24-hour profile of basal levels and response to stimulation and suppression studies.* Neurobiol Aging, 1992. **13**(2): p. 255-60.
347. Gomez, I.M., et al., *GH response to GH-releasing hormone (GHRH) in Alzheimer and vascular dementia. Relation with somatostatin cerebrospinal levels.* Ann Endocrinol (Paris), 1996. **57**(2): p. 107-10.
348. Franceschi, M., et al., *Neuroendocrinological function in Alzheimer's disease.* Neuroendocrinology, 1988. **48**(4): p. 367-70.
349. Ostrowski, P.P., et al., *Meta-Analysis of Serum Insulin-Like Growth Factor 1 in Alzheimer's Disease.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0155733.
350. Counts, S.E., et al., *Cerebrospinal Fluid proNGF: A Putative Biomarker for Early Alzheimer's Disease.* Curr Alzheimer Res, 2016. **13**(7): p. 800-8.
351. Cattaneo, A. and P. Calissano, *Nerve growth factor and Alzheimer's disease: new facts for an old hypothesis.* Mol Neurobiol, 2012. **46**(3): p. 588-604.
352. Schulte-Herbruggen, O., M.C. Jockers-Scherubl, and R. Hellweg, *Neurotrophins: from pathophysiology to treatment in Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(1): p. 38-44.
353. Strobel, S., et al., *Changes in the expression of genes related to neuroinflammation over the course of sporadic Alzheimer's disease progression: CX3CL1, TREM2, and PPARgamma.* J Neural Transm (Vienna), 2015. **122**(7): p. 1069-76.
354. Chen, P., et al., *CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection.* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8090918.
355. Pan, W. and A.J. Kastin, *Why study transport of peptides and proteins at the neurovascular interface.* Brain Res Brain Res Rev, 2004. **46**(1): p. 32-43.
356. Keaney, J. and M. Campbell, *The dynamic blood-brain barrier.* FEBS J, 2015. **282**(21): p. 4067-79.
357. Iadecola, C., *Dangerous leaks: blood-brain barrier woes in the aging hippocampus.* Neuron, 2015. **85**(2): p. 231-3.
358. Montagne, A., et al., *Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus.* Neuron, 2015. **85**(2): p. 296-302.

359. Zhao, Z., et al., *Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier.* Cell, 2015. **163**(5): p. 1064-78.
360. Erdo, F., L. Denes, and E. de Lange, *Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review.* J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(1): p. 4-24.
361. Counts, S.E., et al., *Neuroprotective role for galanin in Alzheimer's disease.* EXS, 2010. **102**: p. 143-62.
362. Shan, L., Y. Dauvilliers, and J.M. Siegel, *Interactions of the histamine and hypocretin systems in CNS disorders.* Nat Rev Neurol, 2015. **11**(7): p. 401-13.
363. Epelbaum, J., et al., *Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: an old story coming of age?* Prog Neurobiol, 2009. **89**(2): p. 153-61.
364. Zorec, R., V. Parpura, and A. Verkhratsky, *Astroglial Vesicular Trafficking in Neurodegenerative Diseases.* Neurochem Res, 2017. **42**(3): p. 905-917.
365. Verkhratsky, A., R. Zorec, and V. Parpura, *Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain.* Brain Pathol, 2017. **27**(5): p. 629-644.
366. Cai, Z., C.Q. Wan, and Z. Liu, *Astrocyte and Alzheimer's disease.* J Neurol, 2017.
367. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia.* Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
368. Lian, H., et al., *NFkappaB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease.* Neuron, 2015. **85**(1): p. 101-15.
369. Lian, H., et al., *Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease.* J Neurosci, 2016. **36**(2): p. 577-89.
370. Watanabe, K., et al., *The participation of insulin-like growth factor-binding protein 3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease.* Mol Brain, 2015. **8**(1): p. 82.
371. Tillo, M., C. Ruhrberg, and F. Mackenzie, *Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity.* Cell Adh Migr, 2012. **6**(6): p. 541-6.
372. Vafadari, B., A. Salamian, and L. Kaczmarek, *MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy.* J Neurochem, 2016. **139 Suppl 2**: p. 91-114.
373. Siskova, Z. and M.E. Tremblay, *Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration.* Neural Plast, 2013. **2013**: p. 425845.
374. Wang, W.Y., et al., *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease.* Ann Transl Med, 2015. **3**(10): p. 136.
375. Zhao, M., et al., *The induction of the TNFalpha death domain signaling pathway in Alzheimer's disease brain.* Neurochem Res, 2003. **28**(2): p. 307-18.
376. Shamim, D. and M. Laskowski, *Inhibition of Inflammation Mediated Through the Tumor Necrosis Factor alpha Biochemical Pathway Can Lead to Favorable Outcomes in Alzheimer Disease.* J Cent Nerv Syst Dis, 2017. **9**: p. 1179573517722512.
377. Hong, S., et al., *Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models.* Science, 2016. **352**(6286): p. 712-716.
378. Elliott-Hunt, C.R., et al., *Activation of the galanin receptor 2 (GalR2) protects the hippocampus from neuronal damage.* J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 780-9.
379. Cheng, Y. and L.C. Yu, *Galanin protects amyloid-beta-induced neurotoxicity on primary cultured hippocampal neurons of rats.* J Alzheimers Dis, 2010. **20**(4): p. 1143-57.
380. Elliott-Hunt, C.R., et al., *Endogenous galanin protects mouse hippocampal neurons against amyloid toxicity in vitro via activation of galanin receptor-2.* J Alzheimers Dis, 2011. **25**(3): p. 455-62.
381. Croce, N., et al., *Neuropeptide Y protects rat cortical neurons against beta-amyloid toxicity and re-establishes synthesis and release of nerve growth factor.* ACS Chem Neurosci, 2012. **3**(4): p. 312-8.
382. Croce, N., et al., *NPY modulates miR-30a-5p and BDNF in opposite direction in an in vitro model of Alzheimer disease: a possible role in neuroprotection?* Mol Cell Biochem, 2013. **376**(1-2): p. 189-95.

383. Singh, Y., et al., *Calcitonin gene-related peptide (CGRP): A novel target for Alzheimer's disease.* CNS Neurosci Ther, 2017. **23**(6): p. 457-461.
384. Jiang, J.H., et al., *Kisspeptin-13 enhances memory and mitigates memory impairment induced by Abeta1-42 in mice novel object and object location recognition tasks.* Neurobiol Learn Mem, 2015. **123**: p. 187-95.
385. Perez-Gonzalez, R., et al., *Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2011. **24 Suppl 2**: p. 17-25.
386. Greco, S.J., et al., *Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2010. **19**(4): p. 1155-67.
387. Campolongo, P., et al., *Systemic administration of substance P recovers beta amyloid-induced cognitive deficits in rat: involvement of Kv potassium channels.* PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78036.
388. Jaeger, L.B., et al., *Effects of orexin-A on memory processing.* Peptides, 2002. **23**(9): p. 1683-8.
389. Xiao, Z., et al., *Activation of neurotensin receptor 1 facilitates neuronal excitability and spatial learning and memory in the entorhinal cortex: beneficial actions in an Alzheimer's disease model.* J Neurosci, 2014. **34**(20): p. 7027-42.
390. Decourt, B., D.K. Lahiri, and M.N. Sabbagh, *Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease.* Curr Alzheimer Res, 2017. **14**(4): p. 412-425.

Enregistrement de la DLT de l'hippocampe de rat durant différentes périodes de l'adolescence avec la technique de patch-clamp

Durant mes travaux de thèse, j'ai contribué à transposer notre modèle animal de *binge drinking* chez des rats adolescents pour une autre technique d'enregistrement de la plasticité. Notre étude exposée dans ce manuscrit ainsi que les précédentes utilisant ce modèle (Silvestre De Ferron *et al.*, 2016; Drissi *et al.*, 2020) utilisent les enregistrements de potentiels de champs, permettant d'étudier la communication des neurones d'un tissu *ex vivo*, ici l'hippocampe, afin d'observer la plasticité de ce dernier après utilisant d'un protocole de stimulation. Cependant, il existe d'autres méthodes pour étudier la plasticité de l'hippocampe, notamment le patch-clamp qui permet d'enregistrer la plasticité non pas d'un tissu mais d'un neurone unique. Cette technique offre plusieurs bénéfices comme par exemple une meilleure isolation du type cellulaire, un contrôle pharmacologique des mécanismes intracellulaires ou encore une meilleure maîtrise des récepteurs étudiés. Dans la littérature, il est usuel de travailler sur des modèles animaux juvéniles, permettant d'acquérir des signaux stables plus aisément. Toutefois, cette contrainte induit des restrictions concernant les modèles animaux utilisés puisqu'elle oblige l'expérimentateur à travailler sur des structures immatures. Aussi et pour développer notre compréhension des mécanismes d'action de l'éthanol sur la plasticité de l'hippocampe à la suite de deux *binges*, nous avons voulu mettre en place un modèle d'animaux *bingers* adolescents que nous pourrions utiliser avec la techique du patch-clamp. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que s'il était possible d'induire de la plasticité synaptique chez des rats âgés de 3 à 7 semaines avec la technique d'enregistrement des potentiels de champs, il n'était pas possible d'induire de la plasticité synaptique de type DLT chez des rats âgés de plus de 4 semaines avec la technique de patch-clamp. Ce résultat rend cette technique inefficace pour étudier la plasticité de type DLT dépendante des récepteurs NMDA ou mGlu chez un modèle de rats adolescents exposés au *binge drinking*.

Patch-clamp recording of LFS-induced long-term synaptic depression in rat hippocampus slices during early and late periods of neurodevelopment

C. Bertrand*, C. Deschamps*, K. Rabiant, S. Peineau, J. Antol, M. Naassila, C. Vilpoux and O. Pierrefiche

UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Université de Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Chemin du Thil, 80025 Amiens

(*) Equally contributed authors

Conflict of interest: none

Corresponding author: O. Pierrefiche

Affiliation as above

e-mail: olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Tel (0033) (0)3-22-82-79-32

Words in the abstract: 263

Words in the main text: 4829

Number of figures: 6

Number of table: 1

Abstract:

Background: Studying synaptic plasticity in rat hippocampus slice is a classic way to analyze cellular mechanisms related to learning and memory. Different modes of recording can be used from extracellular EPSPs field to diverse patch-clamp methods. However, most studies using these latter methods are performed up to the juvenile stage of brain maturation which is known to terminate during late adolescence/early adulthood. Moreover, several animal models of human diseases have been developed at this late stage of brain development. For example, to study the vulnerability of adolescent rat to the cognitive impairment of alcohol, we developed a model of binge-like exposure in which ethanol selectively abolished LFS-induced field EPSPs LTD in rat hippocampus slice.

Methods: In the present study, we sought to use whole-cell patch-clamp recording in voltage-clamp mode to further investigate the mechanisms involved in the abolition of LFS-induced LTD in our model of binge-like exposure in adolescent rat hippocampus slice. In addition, we investigated LFS-induced NMDAR-LTD and mGluR-LTD at different age and changed several parameters to improve recordings.

Results: Using patch-clamp recording, LFS-induced NMDAR-LTD and mGluR-LTD could be measured only until 4 weeks of age but not in older animals. Similarly, chemical mGluR-LTD as well as a combined LFS-LTD involving both NMDAR and mGluR were not measured in older animals. The absence of LFS-LTD was not due to the loss of a diffusible intracellular agent nor to the voltage mode of recording or to the intracellular blockade of either sodium or potassium currents. In contrast to voltage-clamp recordings, LFS-induced LTD was measured at all age tested with field recordings.

Conclusion: We concluded that whole-cell patch-clamp recordings is not suitable for studying synaptic LFS-induced LTD in rats older than 4 weeks of age and thus cannot be used to explore electrophysiolocal disturbances induced for example by alcohol binge drinking during adolescence, the late period of brain maturation.

Key words: NMDAR-LTD, mGluR-LTD, age, patch-clamp, field recording, EPSPs, EPSCs

Introduction

The cellular mechanisms of learning and memory are related to activity-dependent synaptic plasticity, a prominent and specific property of glutamatergic synapses in the hippocampus, a cerebral structure dedicated to memory in mammals (Nabavi et al., 2014; Takeuchi et al., 2014). Synaptic plasticity is bidirectional (Collingridge et al., 2010). It may be expressed as an enhancement of synaptic transmission giving rise to long-term potentiation (LTP), or as a reduction of synaptic transmission through long-term depression (LTD). One of the approaches to study synaptic plasticity is the use of *ex vivo* preparations, that is parasagittal or coronal slices of rat hippocampus in which extracellular field or patch-clamp recordings in the whole-cell configuration have been used. Importantly, a majority of studies using voltage-clamp recording of synaptic plasticity in rat end around one month of age whereas it is now established that brain maturation in mammals extend up to the beginning of the young adult age, that is 2 months in rat and 25 years in human (Gogtay et al., 2004; Schneider, 2013). In addition, there is a recent growing scientific interest in studying sex differences in biological mechanisms, at the age then of adolescence/young adulthood when hormonal cycle take place in females. Furthermore, many experimental models have been developed in adult rat notably for studying specific human brain-related diseases (Dawson et al., 2018; Jeanblanc et al., 2019; Spanagel, 2017; Theyel, 2018).

Studying the effect of ethanol exposure during adolescence became particularly prominent this last two decades because adolescence is a vulnerable period regarding brain maturation and increased risk of binge drinking behaviour. Adolescents consume large volume of alcoholic beverages in a short period of time in order to reach drunkenness rapidly. This behavior is commonly spaced by long interval (several days or weeks) with no alcohol drinking (Maurage

et al., 2020). Many scientific teams then studied the long lasting consequences of such behavior during adolescence in rodent models, including the long-lasting ethanol-induced cognitive deficits in adulthood (Swartzwelder et al., 2015, 2017; Crews et al., 2019). In contrast, few studies have been performed to characterize the effects of just a few binges during adolescence on the short-term cognitive performance, in a context where young people think that just a few binge drinking exposures have no impact on the brain. Furthermore, the cellular mechanisms underlying the effects of ethanol on cognitive processes are not yet fully understood. In this context, our laboratory developed a specific model to better understand in adolescent rat hippocampus slice, the cognitive impairing effects of only two high ethanol intoxications episodes, like those that can be observed in the young adult human population (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). With this model, we measured a selective vulnerability of low-frequency stimulation (LFS)-induced LTD which is abolished and that accompanied memory impairment long after ethanol has been eliminated from the animal. This result is highly relevant since the scientific interest toward hippocampus LTD grew largely over the last decade with determination of the role of LFS-LTD in learning and memory measured in freely-moving adult rodent (Connor and Wang, 2016; Goh and Manahan-Vaughan, 2013; Kemp and Manahan-Vaughan, 2007; Liu et al., 2014; Pinar et al., 2017). In the context of LFS-LTD measurement, important information has been collected on hippocampus slice with field recordings about the maturation or age-dependency of this signal which shows major changes in its properties during the first 2-3 weeks of life in rats (Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Dumas, 2012; Kemp et al., 2000; Overstreet et al., 1997; Sui et al., 2000; Wagner and Alger, 1995) . Similarly, field recorded LTP has been reported to decrease with age (Dumas, 2012), although some authors did not report such result (Kamal et al., 1998). However, it is striking that there is no such data available with

the patch-clamp recording technique. Furthermore, recording LFS-induced LTD with patch-clamp technique at an advanced age such as adolescent/young adult rat, that is during the late periods of brain maturation, will enhance our understanding of the mechanisms that are disturbed in several brain-related diseases that take place at this particular age such as schizophrenia or increased in vulnerability to addiction. However, and to the best of our knowledge, no longitudinal study has measured different forms of LFS-induced synaptic plasticity using both field and patch-clamp recordings from prepuberty to late adolescence in rat. Indeed, there is no patch-clamp recording study dedicated to the effects of ethanol and the analysis of ethanol-induced cellular mechanism during late adolescent period despite all advantages of this method. Hence, the present study sought to determine if LFS-induced LTD can be recorded with the patch-clamp technique during the late period of brain maturation at CA3-CA1 synapse in rat hippocampus slices in the context of only two binges of alcohol in order to better understand the previous results (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). Strikingly, our results show that it was not possible to record LFS-induced LTD with patch-clamp in the whole-cell configuration in slices from animals older than 4 weeks and despite several attempts to adapt our experimental conditions. In contrast, field recordings were successful at any age.

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed in agreement with the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals (2010/63/UE, CE Off. J. 20 October 2010), the French decree no. 2013-118, and the agreement of the ethic committee (CREMEAP; experiments #3829 and

#8759). Male Sprague-Dawley rats were studied from prepubertal (Postnatal day P14-18) to late adolescence (P38-53) periods and were housed in a temperature (20°C) and humidity-controlled vivarium (55 ± 10%) on a 12 h/12 h light/dark cycle (light phase from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.), and provided *ad libitum* access to food and water. Animals were purchased from Janvier Labs (France) and delivered at the age of interest. Prepubertal animals were housed 5 per cage with a nurturing mother and were weaned at P21. After weaning animals were housed 2 to 3 per cage. Only males were studied since this study is based on previous report from our laboratory in which only males were tested.

Ethanol treatment

Ethanol (EtOH; from VWR, Fontenay-sous-Bois, France) injections were performed as previously described in our laboratory (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). Briefly, animals received 2 i.p injections of EtOH (3g/kg; 15%v/v) 9 hours apart on a single day. All measurements were performed 48 hours after the first ethanol injection.

Hippocampus slice

Slices preparation, rest and recording were done using an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 124 NaCl, 26 $NaHCO_3$, 15 glucose, 3 KCl, 2.7 $MgSO_4$, 2 ascorbic acid, 2 $CaCl_2$, 1.2 NaH_2PO_4; pH 7.4, 305-310mosmol/L). After decapitation, brains were rapidly removed and immersed in cold oxygenated (95% O_2; 5% CO_2) aCSF with an additional 9 mM $MgCl_2$. Brains were then cut into 400µm thick coronal hippocampal slices using a vibratome (Leica VT1200S, Rueil-Malmaison, France). Slices were maintained at room temperature for 2 hours with an aCSF supplemented with 1.25mM $MgCl_2$.

Electrophysiology

Patch-clamp recording. Slices were transferred in a recording chamber installed on the stage of an upright microscope (Olympus BX51WI, Japan), held with a nylon net and continuously perfused at 3mL/min with an oxygenated aCSF (95% O_2; 5% CO_2) containing an additional 10 µM (-)-bicuculline methobromide. Whole-cell patch-clamp recordings were made from pyramidal cells located in the CA1 field of the hippocampus and under visual guidance. Neurons were recorded in either voltage- or current-clamp mode with a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Axon Instruments, San Jose, CA, USA) and digitized using a PCIe-6321 interface (National Instruments, Hungary). Data were acquired, stored and analyzed using the WinLTP Software (WinLTP Ltd, Bristol, UK). Whole-cell recordings were obtained from the soma using patch electrodes pulled from borosilicate glass capillaries (1.5 OD x 0.86 ID x 100 L mm) with a resistance of 2-4MΩ when filled with (in mM): 130 $CsMeSO_3$, 10 HEPES, 8 NaCl, 5 QX-314 bromide, 4 Mg-ATP, 0.5 EGTA and 0.3 Na-GTP (pH 7.4, 305 mosmol/L). Neurons were voltage clamped at -70mV holding potential and currents were recorded at room temperature. Cell input resistance and membrane capacitance transients were monitored during the recording by applying a −10mV voltage step (150ms duration) before each stimulation. Cells with a series resistance above 40MΩ were rejected. All recordings were low-pass filtered at 5kHz and acquired at 10kHz. A bipolar stimulating electrode (Nickel 80%/Chromium 20%) was placed in the *stratum radiatum* to stimulate Schaffer collateral-commissural fibers at 0.1Hz with stimulation of 0.02-0.1msec duration and at 2-30mA intensity. In all experiments, a cut was made between CA3 and CA1 to reduce hyperexcitability and the possible induction of seizure-like activity during test stimulation.

Field recording. Slices preparation and aCSF were the same as described above except we did not remove CA3 unless noted. Slices were transferred in a recording chamber continuously perfused at 6mL/min with an oxygenated aCSF (95% O_2; 5% CO_2) and held with a nylon net. Extracellular electrode was obtained from pulling borosilicate glass capillaries (1.5 OD x 1.17 ID x 100 L mm) and filled with a 3M NaCl (1-3MΩ) solution. Recordings were made into the *stratum radiatum* of CA1 while Schaffer collaterals were stimulated for 0.1ms at 0.05Hz, and 1-5mA intensity using a bipolar stimulating electrode (Platinum Iridium, FHC, USA). Bath temperature was maintained at 28.5°C. fEPSPs were amplified (x1000-2000) and filtered (1-3 KHz) using a Grass P511 AC Amplifier (AstroNova, formerly Astro-med, Inc, West Warwick, RI) then recorded using a CED Micro3 1401 acquisition unit (CED, Cambridge, UK) coupled to a computer. An input/output (I/O) curve was established for each slice and protocols of LTD induction were performed at 50% of the maximal response obtained from the I/O curve. Data were stored and analyzed using Signal software (CED, Cambridge, UK).

Plasticity protocols

With whole-cell patch-clamp recordings (Collingridge et al., 2010), after a stable EPSCs baseline period of 10min, NMDAR-LTD was induced in P14-21 rats with 300 single square pulses delivered at 0.66Hz while the membrane potential of the neuron was held at -40mV (LFS300). To induce mGluR-LTD we used 300 pairs of stimulation with a 200ms interval delivered at 0.66Hz while holding the membrane potential at -70mV (pLFS200-300) in P14-21 rats and 900 pairs of stimulation with a 200ms interval (pLFS200-900) at 1Hz and at -70mV holding potential for older animals. To induce a combined LTD (i.e., NMDAR- + mGLUR-LTD) we used the pLFS200-900 mGluR-LTD protocol at 1Hz while holding the membrane potential at -40mV. When using patch-clamp recording in current-clamp mode, we tested LFS900

applied at 5Hz (Oliet et al., 1997). In field recording conditions, we focused on NMDA-dependent form of LTD (Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992). After a stable EPSPs baseline of 10 min, LTD was induced with LFS900 single pulse protocol delivered at 1Hz in 3 weeks old animals whereas in older animals, we used pLFS200-900 at 1Hz. See table 1 for a summary of the different protocols used.

Drugs

Bicuculline methobromide was obtained from HelloBio (Bristol, UK) and prepared in distilled water as 10mM stock solution. QX-314 bromide was obtained from HelloBio and directly used for patch-clamp intracellular solution at a concentration of 5mM. Cyanquixaline (CNQX; 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) and (*S*)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) were obtained from Sigma-Aldrich and prepared as stock solution in DMSO (10mM) and in distilled water (25mM), respectively.

Statistical analyses and data representation

For synaptic plasticity, we compared the mean amplitude of a 10min baseline recording taken before LTD to the mean amplitude of the last 10min recording after LTD induction. All data are presented as mean ± SEM with N= representing the number of animal and n= the number of cells or slices recorded. Statistical analysis of synaptic plasticity was performed with unpaired Student *t* test. In all tests, we chose $P < 0.05$ as significant.

Results

Effects of ethanol on LFS-induced LTD with field and whole-cell patch-clamp recordings

Adolescence is a vulnerable period for the consumption of drugs of abuse and many of those substances elicit memory impairment. We thus tested the effects of two ethanol intoxication episodes on NMDA-dependent pLFS200-900-induced homosynaptic LTD of fEPSPs (Kemp et al., 2000) in late adolescent rat hippocampus slices (P46-P53). The results showed that 48h after ethanol exposure, synaptic LFS-induced LTD was abolished (Fig. 1A1-A2). Control LTD reached 74% ± 2% ($P < 0.001$; n = 4) of baseline values whereas after ethanol, LTD magnitude was 97% ± 3% ($P < 0.001$ compared to control; n = 5). Strikingly, we failed to obtain a similar result with the whole-cell patch-clamp recording; there was no pLFS200-900-induced LTD at this age (Fig. 1B1-B2). Indeed, 50 min after LFS-induced LTD, patch-clamp recordings of EPSCs indicated 93% ± 5% ($P = 0.48$; n = 6) of baseline values. In fact, to obtain a comparable abolition of LFS-induced NMDA-LTD recorded with the patch-clamp technique we had to use less mature animals at P14-P21 (Fig. 1C1-C2). Here, control pLFS200-900 LTD reached 54% ± 3% ($P < 0.001$; n = 4) of baseline values whereas 48h after ethanol intoxications LTD was 88% ± 7% ($P < 0.05$ compared to control; n = 5). This first series of experiments replicate our previous results obtained with field recordings (Silvestre de Ferron et al., 2015; Drissi et al., 2020) but failed to demonstrate the replication of the result with patch-clamp recordings, revealing that the analysis of specific transmembrane currents targeted by ethanol with this method is not possible during late-adolescent period. To better understand the discrepancies between patch-clamp and field recordings during late brain maturation we decided to further investigate the conditions of LFS-induced LTD in patch-clamp recordings.

No LFS-induced LTD in late adolescent rat hippocampus slices recorded with patch-clamp

We first tested whether synaptic NMDAR-LTD could be induced in CA1 pyramidal neurons of hippocampus slices from late adolescent rats using the patch-clamp recording technique in the whole-cell configuration while Schaffer collaterals were electrically stimulated with LFS protocol. The results showed that 50min following LFS300 at -40mV holding potential, EPSCs amplitude were 98% ± 3% of baseline (Fig. 2A1-A2; *P* = 0.38; n = 11). In order to rule out the possibility of wrong recordings conditions that would lead to a blockade, or to an absence of NMDA currents, we used CNQX, a competitive AMPA/kaïnate receptor antagonist. CNQX was bath applied at 10µM while holding potential was set at -70mV. When AMPA currents were blocked, the NMDA currents were unravelled by holding the membrane potential at -40mV (Fig. 2B), demonstrating that NMDA currents were present to trigger an NMDAR-LTD in our experimental conditions. We next tested the induction of group 1 metabotropic glutamate receptors-LTD (i.e., mGluR-LTD) in slices from P38-46 old rats since older animals did not respond (Fig.1 B). Similarly, to NMDAR-LTD, we failed to induce mGluR-LTD. Indeed, 50min following induction, EPSCs amplitude reached 97% ± 6% of baseline values (Fig. 2C1-C2; *P* = 0.69; n = 5). Since both NMDAR- and mGluR-dependent synaptic LTD were not induced separately in hippocampus slices from late adolescent rats, we investigated whether a more robust LTD, combining both types of receptors, could be obtained. To induce a so-called combined synaptic LTD, we used an LFS protocol that recruit mGlu receptors while holding potential was set at -40mV to recruit NMDA receptors (Fig. 3A1-A2). In these conditions, EPSCs amplitude were 93% ± 5% of baseline (*P* = 0.19; n = 7) 50min following the induction protocol, showing that this combined form of LTD was not triggered in late adolescent rat. mGluR-LTD can also be induced pharmacologically. We thus tested the group 1 mGluR agonist, (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG) which was bath applied at 50µM concentration for 10min before being washed-out (Fig. 3B1-B2). In these conditions, 50min following DHPG

application, EPSCs amplitude were 101 ± 4% of baseline (*P* = 0.87; n = 5) revealing no chemically-induced mGluR-LTD although DHPG showed an effect on synaptic currents since 5min following DHPG application, EPSCs amplitude were 69% ± 7% of baseline (*P* < 0.01; n = 5).

Age-dependency of LTD using patch-clamp recording technique and LFS protocols

One possibility to explain the difficulty to induce LTD with patch-clamp might be the age of the animals as it has been described for field recordings (Kemp et al., 2000). Therefore, we tested hippocampal slices from younger rats (P14-21) in which synaptic NMDAR-LTD induction with LFS300 has already been demonstrated using whole-cell patch-clamp (Peineau et al., 2007). In young rat slices, 50min following LFS300 at –40 mV holding potential, EPSC amplitude was 57 ± 4% of baseline (P < 0.001; n = 7, Fig. 4A1-A2). Similarly, we measured a synaptic mGluR-LTD reaching 49 ± 6% (Fig. 4B1-B2; P < 0.001; n = 7) of baseline, 50min after pLFS200-300, an adapted protocol for young rats.

These results were next extended to animals from 3 to 7 weeks of age, i.e., ranging from pre-puberty to late adolescence (Fig. 5) in order to find a precise age at which the capacity to record an LFS-induced LTD with whole-cell patch-clamp is lost. For this purpose, we compiled all types of LTD at the different ages tested. Thus, at 3 weeks of age (P14-21), both NMDAR- and mGluR-LTD could be induced and recorded with patch-clamp with an EPSCs amplitude reaching 53 ± 4% (*P* < 0.001; n = 14 cells including 7 for each type of LTD) of baseline 50min after LTD induction (Fig. 5A1). At 4 weeks of age (P22-29) EPSCs amplitude reached 76 ± 6% (*P* < 0.01; n = 7 cells including 6 for NMDAR-LTD and 1 for mGluR-LTD; Fig. 5A2). However, at 5 weeks (P30-37), 6 weeks (P38-45) and 7 weeks (P46-53) of age, patch-clamp recorded-LTD

was never induced with any LFS protocol (14 cells for NMDAR-LTD, 5 for mGluR-LTD and 7 for combined LTD; Fig. 5A3-A4). More precisely, 50min following LTD induction, EPSCs amplitude was 100 ± 3% (P = 0.95; n = 6), 95 ± 3% (P = 0.12; n = 9) and 97 ± 3% (P = 0.34; n = 11) of baseline at 5, 6 and 7 weeks of age, respectively. Altogether, no LFS-induced LTD was recorded above 4 weeks of age (Fig. 5C1).

Patch-clamp versus field recordings

In our experimental conditions, the patch-clamp recording technique did not allow to record LFS-induced LTD in hippocampus slices from rats older than 4 weeks. We next asked whether the same result could be observed with the field recording technique. Using the same range of age than with patch-clamp and focusing on NMDAR-LTD (Fig. 5B, C), we found that the induction of NMDA-LTD was always successful from 3 to 7 weeks of age. In these conditions, 50 min following the induction protocol, EPSPs slope at 3 weeks was 69 ± 5% ($P < 0.01$; n = 4, N=4) of baseline; at 4 weeks, values reached 75 ± 4% (P<0.001; n=5, N=3); at 5 weeks it reached 79 ± 3% (P<0.001; n=4, N=2); at 6 weeks of age EPSPs slopes was 74 ± 2% (P<0.001; n=4, N=3) and in 7 weeks old rats it was 70 ± 7% ($P < 0.01$; n = 4, N=3) (Fig. 5B1-B2). Hence, in comparison to patch-clamp, field recording was successful at any age tested (Fig. 5C1-C2).

The wash-out hypothesis and LFS-induced LTD in a configuration close to field recording

Considering the difference between field and patch-clamp recordings, we tested the hypothesis that an unidentified necessary component to induce synaptic LTD in slices from adolescent rats could be washed-out during the patch-clamp recording, as it was shown with synaptic LTP in rats (Malinow and Tsien, 1990). To test this hypothesis, we tried to induce a

combined LTD (i.e., mGlu-R- + NMDA-R-LTD) applied within 5min of recordings in the whole-cell configuration. The results showed that EPSCs amplitude was 107 ± 6% of baseline (*P* = 0.3; n = 5), 50min following such a protocol of LTD induction (Fig. 6A1-A2). A last attempt to induce LTD with the patch-clamp technique was performed trying to repeat as close as possible, the experimental conditions of field recordings. First, we tested the whole-cell configuration recording in current-clamp mode and adapted our stimulation protocol according to Oliet et al. (1997). We thus used LFS900 delivered at 5 Hz (Fig. 5B1-B2) in a medium containing 4mM of each Ca^{2+} and Mg^{2+} (Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio = 1). In these conditions, EPSCs amplitude was 98 ± 4% of baseline (p = 0.6; n = 3) 50min following the stimulation. Second, in a similar condition as above, we adapted the intracellular recording solution, removing QX-314 to release voltage-activated sodium channels and replacing $CsMeSO_3$ with $KMeSO_3$ to release potassium channel. In these conditions, EPSCs amplitude was 95 ± 4% of baseline (*P* = 0.27; n = 5) 50min following LFS900 at 5Hz as used in current clamp mode (Fig. 5C1-C2).

Discussion

Based on our previous results showing abolition of LFS-induced LTD during adolescence after two alcohol binge-like episodes using extracellular EPSPs field recordings, we sought to use patch-clamp recording to improve our knowledge of the mechanisms of synaptic plasticity that are disturbed by ethanol at this late stage of brain development. Strikingly, we failed to measure an LFS-induced LTD with whole-cell patch-clamp recordings and we thus investigated the mechanism and the developmental aspect underlying this technical discrepancy.

Hippocampus LFS-induced LTD and ethanol exposure during adolescence

It is now well established that ethanol exposure during adolescence in rodents may lead to some cognitive and behavioral deficits long after a period of abstinence, i.e. at adulthood (Alaux-Cantin et al., 2013; Swartzwelder et al., 2015, 2017; Crews et al., 2019). However, the cellular mechanisms responsible for such long-term disturbances of learning and memory are still under investigation. This is particularly important in regard to the adolescent period because brain maturation is still ongoing in mammals, including humans (Gogtay, 2014, 2016), suggesting that ethanol interferes with major late developmental brain processes. Therefore, identifying the mechanisms of action of ethanol during adolescence and specially in the case of few exposures may help to understand what cellular processes are key players in the long lasting disturbances. In this context, we showed here that hippocampus LFS-LTD is abolished in late adolescence 48h after only two binges, as we previously reported (Silvestre de Ferron et al., 2015; Drissi et al., 2020). This selective abolition, concomitant to learning deficits, and accompanied with a high level of GluN2B (Silvestre de Ferron et al., 2015; Drissi et al., 2020) needs to be further understood. For this purpose, the use of patch-clamp recordings appears necessary as it allows transmembrane currents and cell specific plasticity analysis. However, we found that during late adolescence in rat, LFS-LTD was not induced with the patch-clamp technique. Although this study is the first attempt to test patch-clamp recording during late brain development after ethanol exposure, we believe that successful use of this technique at this age will bring important data since juvenile animals (ca. younger that P30; Schneider et al., 2013) are not submitted to physiological, hormonal and social modifications that all participate in the final maturation of brain networks.

Lack of LFS-induced LTD using whole-cell voltage-clamp recording in adolescent rat

The literature shows that it is not unusual to measure synaptic transmission and plasticity with field recording technique while patch-clamp is fundamentally less used. The choice between these two approaches is naturally related to the scientific question asked since patch-clamp is mainly dedicated to the study of transmembrane currents whereas field recording can be considered as sufficiently effective to demonstrate the presence, or absence, and the quality of the induced plasticity. However, and although whole-cell voltage-clamp recording is more difficult to enforce than field recording, studying synaptic plasticity with patch-clamp allows pharmacological manipulation of the internal compartment of the recorded neuron and the investigation of cell type specific plasticity. This is particularly interesting when we know that long-lasting recording of LTD with patch-clamp has been reported despite all the technical problems that may be encountered (Collingridge et al., 2010; Oliet et al., 1997). In addition, using whole-cell recordings allow LTD to be induced with several different forms of stimulating protocol because the membrane potential of the recorded post-synaptic cell can be altered. LTD can also be induced by appropriately timed back-propagating action potentials in current clamp mode. In this latter case the resulting plasticity is a form of spike-timing dependent plasticity (STDP).

In our study, regarding late adolescent animals (P38-P45), we found that an NMDAR-dependent form of LTD in CA1 area was not induced with voltage-clamp. Strikingly, the NMDAR current was present in our conditions and hence, it should have been possible to induce an NMDA-dependent LTD following the electric induction protocol. Furthermore, a similar lack of LTD was found when we tested mGluR-dependent LTD induced either with an electric LFS or with bath application of DHPG, an agonist of mGlu type I receptors. At last, at this age, we were unable to induce an LTD that combined both types of glutamate receptors

recruited during the induction protocol. In total, these results would suggest that LTD is not induced at this age in CA1 area of hippocampal coronal slices of rat or, alternatively, that whole-cell voltage-clamp technique is not suited for LFS-induced LTD recordings at this late stage of brain maturation. In support of this latter proposal, is the fact we were able to record LTD at younger ages. Indeed, testing the induction of LTD in younger animals showed that both NMDAR- and mGluR-dependent LTD were recorded with whole-cell patch-clamp while we used the same LFS as in older animals and a protocol adapted to the young age. More precisely, LFS-induced LTD is not possible to record with patch-clamp once the animals reached 4 weeks of age (i.e., 28 days) since at these age and beyond, none of the 3 different types of LTD we tested was evoked. Therefore, an alternative to envisage in order to explain the lack of LFS-induced LTD at adolescent age was the experimental conditions of recordings that need to be change along this second month of life in rat.

Changing the experimental conditions did not help recording LTD with voltage-clamp

To better understand the lack of LFS-induced LTD in P38-P45 old animals recorded with patch-clamp, we tested several possibilities. First, we tested whether an intracellular diffusible agent was lost within the first minutes of the formation of the whole-cell configuration which may disrupt certain forms of synaptic plasticity (Kullmann and Lamsa, 2007). Second, we tested the idea that recordings of LFS-induced LTD were not possible in voltage-clamp but could be performed in current-clamp mode and third, we hypothesized that the composition of the intracellular solution used in voltage-clamp does not allow LFS-induced LTD to develop. Interestingly, testing independently any of these three possibilities never revealed an LTD, suggesting that none of these parameters were dramatically involved in the lack of LFS-

induced LTD in hippocampus slices from late adolescent animals. Furthermore, changing the Mg2+/Ca2+ ratio to 4mM/4mM in whole-cell current clamp recordings and adapting the induction protocol to the literature (Oliet et al., 1997) was without success. Another factor to take into account is the amount of inhibition while recording LTD. In fact, GABA inhibitions have been shown to constrain LTD (Wagner and Alger, 1995). However, in our experiments, all patch-clamp recordings were performed in presence of bicuculline and in absence of the CA3 field thereby reducing strongly the amount of synaptic inhibition into the network. Our results then suggest that GABAA inhibitions cannot account for the lack of LTD recorded with the whole-cell patch-clamp technique at the later stage of development. In this context, an interesting comparison could be made with LTP recorded with whole-cell (Meredith et al., 2003). In this study, the authors showed that synaptic plasticity rules to trigger LTP evolve with the age of the animals from P9 to P45, due to GABAA synaptic transmission as it was reversed in presence of bicuculline. Postsynaptic mGluRs are localized preferentially in perisynaptic/extrasynaptic zones (Luján et al., 1996) and the use of a membrane glutamate transporter inhibitor such as TBOA, could have possibly helped triggering mGluR-LTD in adolescent animals. However, we tested an induction protocol known to trigger mGluR-dependent LTD and we bath applied an mGluR agonist, and both methods were unsuccessful. It is then difficult to consider the mGluRs were not activated in our conditions. Furthermore, high-resistance pipettes have been shown to reveal mGluR dependent LTD in CA1 neurons of cultured slices (Fan et al., 2010). However, this latter result would suggest that a diffusible factor was lost with low-resistant recording pipette, a possibility we can rule out according to our recordings performed within 5min following the breaking of the seal.

Field recordings are more reliable than patch-clamp recordings for LFS-induced LTD

In contrast to voltage-clamp recordings we found that field recordings of LFS-induced LTD was successful using induction protocol known to trigger NMDAR-dependent LTD from P14 to P45 in rat hippocampus slice (Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992). Many evidences indicate that in CA1, LTD is easily obtained in neonates while its magnitude is much lower in more mature animals (Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Sui et al., 2000; Wagner and Alger, 1995). Also, the strain of rat is not critical to observe the maturation of LTD with field recordings. Sui et al. (2000) reported in Wistar rats that synaptic LTD triggered with LFS900 decreased in amplitude with the age to reach about 70% of baseline level. Also, LTD of fEPSPs was obtained with a prolonged stimulation of the Schaffer collateral-commissural fibers at 5–10 Hz frequencies in hippocampus slice from 30-40 days old Wistar rats (Berretta and Cherubini, 1998). Using another type of induction protocol in slices from P14 to P252 days old Wistar male rats, Kamal et al. (1998) found a decrement in LTD magnitude between young and old animals in fEPSP analysis. Similar results were obtained using Sprague-Dawley rats in which LFS900-induced LTD declined in amplitude from 70% to 94% of baseline value (Dumas, 2012; Escobar et al., 2011), with a beginning of decline around the third week of life. These results revealed the maturation profile of LFS-induced LTD which, importantly, occur in all strains of laboratory rat. It also shows that LTD maturation can be observed with many different induction protocol (Kemp et al., 2000). Our results using field recordings in Sprague-Dawley rats, are in total accordance with such a literature (Dumas, 2012; Escobar et al., 2011) since we found a small but progressive reduction in LTD amplitude between 3 and 4 weeks of age when we used LFS900 and then a stable LTD magnitude beyond 4 weeks of age reaching about 70% of baseline values. Given the existing literature, it is difficult to consider that the LFS protocols we tested were not suited for triggering LTD in voltage-clamp mode since in the rat hippocampus, such LFS and pLFS are often sufficient (Bliss

and Collingridge, 1993; Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992).

Limits of the study

Our present study is necessarily incomplete in the sense we did not test all possibilities to improve our whole-cell patch-clamp recordings. Indeed, and to the best of our knowledge, there is only one paper reporting patch-clamp recordings of LTP (and depotentiation) in hippocampus slices from 80-90 days old rats (Tozzi et al., 2019). This latter study suggests that space-clamp error is not the origin of the failure in LTD recordings in slices from adolescent and mature animals. Nonetheless, some differences exist in the experimental conditions with Tozzi et al. (2019). These authors illustrated LTP in adult rat using a slice half thinner than ours, a higher recording temperature (34°C versus 22°C) and a recorded neuron with possibly a higher basal level of intracellular free calcium. More precisely, Tozzi et al. used 0.1 mM CaCl2 and 2 mM MgCl2 in presence of 0.1 mM EGTA whereas we used no intracellular MgCl2 and 0.5 mM EGTA. Indeed, it is known that plasticity outcome correlates with the magnitude of dendritic calcium transients (Cormier et al., 2001) and can be predicted by the kinetic profile of these transients (Ismailov et al., 2004). In the same vein, the concentration of intracellular calcium buffer used affects directly LTD magnitude of NMDA-R (Harney et al., 2006). According to this latter study, the intracellular solution we used with patch-clamp was possibly not adapted for LTD measurements. However, answering this question will require additional data set.

In total, our study provides original results since, to our knowledge, the influence of developmental aspects on the mechanisms of synaptic plasticity studied with the combination

of different electrophysiological techniques remains poorly explored. It is all the more surprising that many brain pathologies emerge at the end of adolescence. We conclude that LFS-induced LTD is hardly triggered in hippocampus slices from rats older than 4 weeks with conventional experimental environment and that further experiments would be needed to define specific conditions to improve the success of such recordings.

Funding and Disclosure

This work has been supported by Université de Picardie Jules Verne, the French ministry of Research which financed the PhD position of CB and CD and INSERM organization.

References

Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, Botia B, Pierrefiche O, Vilpoux C, Naassila M (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. Neuropharmacology 67:521-31

Berretta N, Cherubini E (1998) A novel form of long-term depression in the CA1 area of the adult rat hippocampus independent of glutamate receptors activation. Eur J Neurosci 10:2957–2963.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361:31–39.

Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. Nature Reviews Neuroscience 11:459–473.

Connor SA, Wang YT (2016) A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. Neuroscientist 22:359–371.

Cormier RJ, Greenwood AC, Connor JA (2001) Bidirectional synaptic plasticity correlated with the magnitude of dendritic calcium transients above a threshold. J Neurophysiol 85:399–406.

Crews FT, Robinson DL, Chandler LJ, Ehlers CL, Mulholland PJ, Pandey SC, Rodd ZA, Spear LP, Swartzwelder HS, Vetreno RP (2019). Mechanisms of Persistent Neurobiological Changes Following Adolescent Alcohol Exposure: NADIA Consortium Findings. Alcohol Clin Exp Res.;43(9):1806-1822

Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C (2018) Animal models of neurodegenerative diseases. Nat Neurosci 21:1370–1379.

Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, Alary R, Peineau S, Gosset P, Sueur H, Marcq I, Debuysscher V, Naassila M, Vilpoux C, Pierrefiche O (2020) Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. Addict Biol 25:e12760.

Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A 89:4363–4367.

Dumas TC (2012) Postnatal alterations in induction threshold and expression magnitude of long-term potentiation and long-term depression at hippocampal synapses. Hippocampus 22:188–199.

Escobar M, Crouzin N, Cavalier M, Quentin J, Roussel J, Lanté F, Batista-Novais AR, Cohen-Solal C, De Jesus Ferreira M-C, Guiramand J, Barbanel G, Vignes M (2011) Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. Biol Psychiatry 70:992–999.

Fan W, Ster J, Gerber U (2010) Activation conditions for the induction of metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal CA1 pyramidal cells. J Neurosci 30:1471–1475.

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical

development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8174–8179.

Goh JJ, Manahan-Vaughan D (2013) Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus. Cereb Cortex 23:1118–1125.

Harney SC, Rowan M, Anwyl R (2006) Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering. J Neurosci 26:1128–1132.

Ismailov I, Kalikulov D, Inoue T, Friedlander MJ (2004) The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. J Neurosci 24:9847–9861.

Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP, Naassila M (2019) Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. Neurosci Biobehav Rev 106:112–121.

Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH, Urban IJ (1998) Increasing age reduces expression of long-term depression and dynamic range of transmission plasticity in CA1 field of the rat hippocampus. Neuroscience 83:707–715.

Kemp A, Manahan-Vaughan D (2007) Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? Trends Neurosci 30:111–118.

Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI (2000) Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. European Journal of Neuroscience 12:360–366.

Kullmann DM, Lamsa KP (2007) Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. Nat Rev Neurosci 8:687–699.

Liu X, Gu Q-H, Duan K, Li Z (2014) NMDA receptor-dependent LTD is required for consolidation but not acquisition of fear memory. J Neurosci 34:8741–8748.

Luján R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. European Journal of Neuroscience 8:1488–1500.

Malinow R, Tsien RW (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. Nature 346:177–180.

Maurage P, Lannoy S, Mange J, Grynberg D, Beaunieux H, Banovic I, Gierski F, Naassila M (2020) What We Talk About When We Talk About Binge Drinking: Towards an Integrated Conceptualization and Evaluation. Alcohol Alcohol 55:468-479.

Meredith RM, Floyer-Lea AM, Paulsen O (2003) Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. J Neurosci 23:11142–11146.

Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. Neuron 9:967–975.

Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. Nature 511:348–352.

Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. Neuron 18:969–982.

Overstreet LS, Pasternak JF, Colley PA, Slater NT, Trommer BL (1997) Metabotropic glutamate receptor mediated long-term depression in developing hippocampus. Neuropharmacology 36:831–844.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JTR, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. Neuron 53:703–717.

Pinar C, Fontaine CJ, Triviño-Paredes J, Lottenberg CP, Gil-Mohapel J, Christie BR (2017) Revisiting the flip side: Long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus. Neurosci Biobehav Rev 80:394–413.

Schneider M (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. Cell Tissue Res 354:99–106.

Silvestre de Ferron B, Bennouar K-E, Kervern M, Alaux-Cantin S, Robert A, Rabiant K, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O (2015) Two Binges of Ethanol a Day Keep the Memory Away in Adolescent Rats: Key Role for GLUN2B Subunit. Int J Neuropsychopharmacol 19.

Spanagel R (2017) Animal models of addiction. Dialogues Clin Neurosci 19:247–258.

Sui L, Ge SY, Ruan DY, Chen JT, Xu YZ, Wang M (2000) Age-related impairment of long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus following developmental lead exposure in vitro. Neurotoxicol Teratol 22:381–387.

Swartzwelder HS, Risher ML, Miller KM, Colbran RJ, Winder DG, Wills TA (2016) Changes in the Adult GluN2B Associated Proteome following Adolescent Intermittent Ethanol Exposure. PLoS One. 2016 11(5):e0155951.

Swartzwelder HS, Park MH, Acheson S (2017) Adolescent Ethanol Exposure Enhances NMDA Receptor-Mediated Currents in Hippocampal Neurons: Reversal by Gabapentin. Sci Rep. 7:13133.

Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Morris RGM (2014) The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 369:20130288.

Theyel B (2018) Animal Models in Psychiatric Disease: A Circuit-Search Approach. Harv Rev Psychiatry 26:298–303.

Tozzi A, Durante V, Manca P, Di Mauro M, Blasi J, Grassi S, Calabresi P, Kawato S, Pettorossi VE (2019) Bidirectional Synaptic Plasticity Is Driven by Sex Neurosteroids Targeting Estrogen and Androgen Receptors in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. Front Cell Neurosci 13:534.

Wagner JJ, Alger BE (1995) GABAergic and developmental influences on homosynaptic LTD and depotentiation in rat hippocampus. J Neurosci 15:1577–1586.

Figure Legends

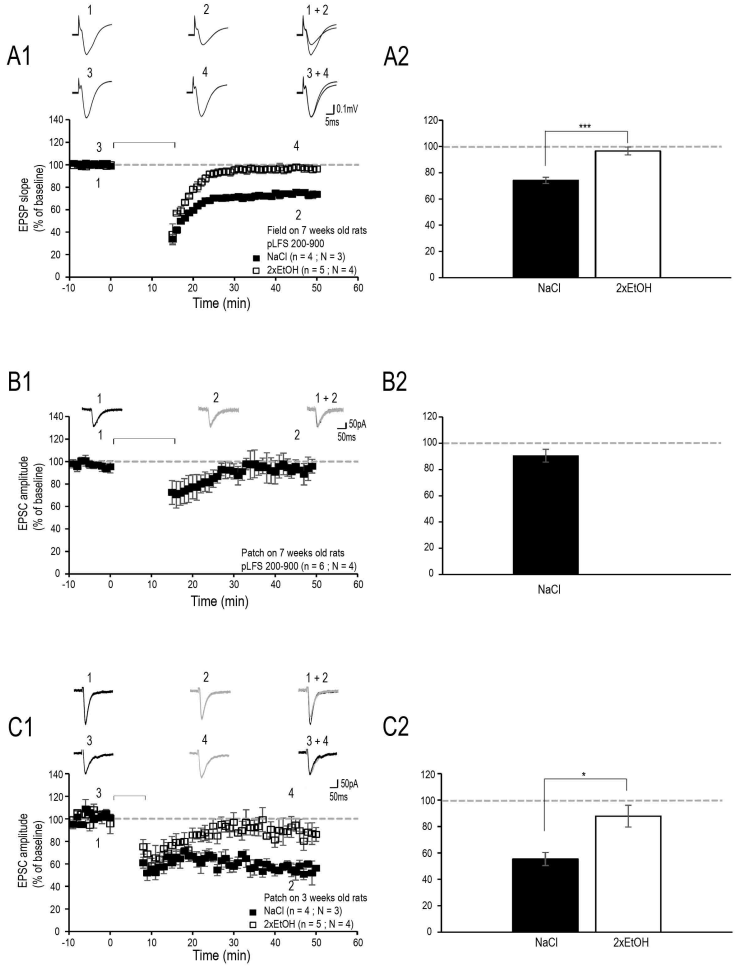
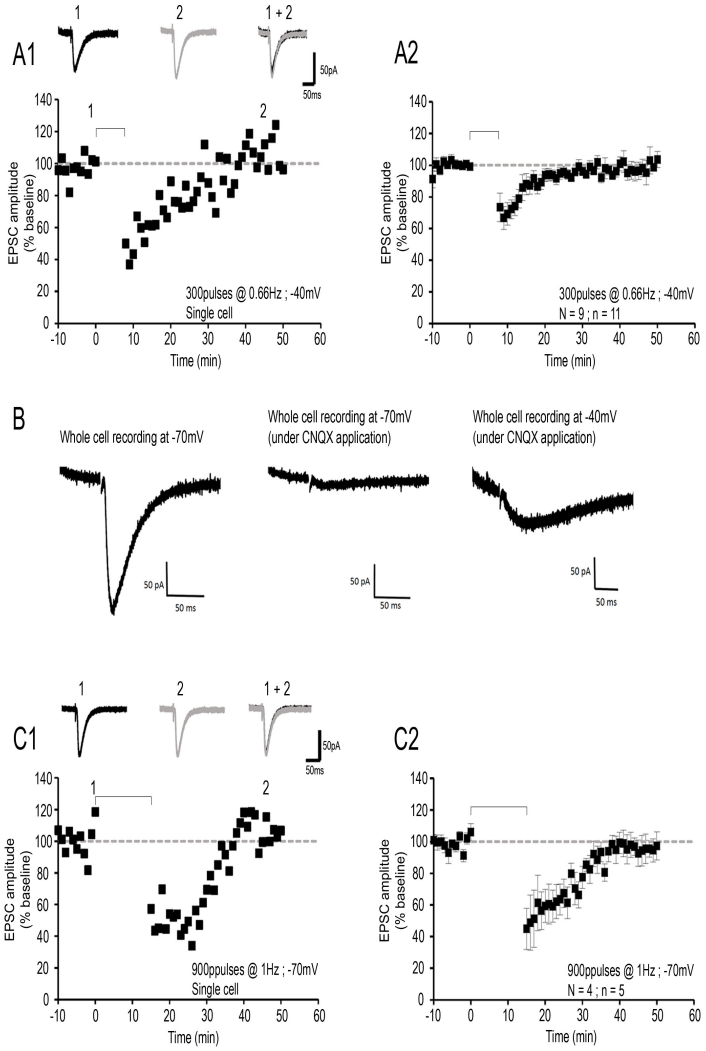


Figure 1. Effects of ethanol intoxication on homosynaptic NMDA-dependent LTD in CA1 area. (A) Extracellular EPSPs field recording in control slices (A1: N = 3; n = 4) and slices from animal treated with ethanol (2x3g/kg, i.p.) 48h before electrophysiology (A2: N = 4; n = 5). Upper traces are averaged recordings taken at time points indicated 1, 2, 3 and 4 in the time course of LTD. **(B)** No LFS-induced LTD with whole-cell patch-clamp technique in CA1 pyramidal neuron of similar aged animal than in A. **(C)** whole-cell patch-clamp recordings performed in animals younger than 3 weeks showed an abolition of NMDA-dependent LTD 48h after ethanol (control N = 3; n = 4 and ethanol N = 4; n = 5). Calibration bars: 50 pA/50 ms. “N” is the number of animals and “n” the number of cells or slices.



<u>Figure 2:</u> No NMDAR- and no mGluR-LTD in hippocampal slices of adolescent (P38-45) rats with whole-cell patch-clamp recording. **(A)** Representative EPSC traces, single example **(A1)** and pooled data **(A2)** illustrating the induction of NMDAR-LTD (N = 9; n = 11). (**B**) Representative EPSC traces of recorded AMPA current (left) and NMDA current in presence of CNQX (right). (**C**) Representative EPSC traces, single example (**C1**) and pooled data (**C2**) of whole-cell patch-clamp recordings illustrating the induction of mGluR-LTD (N = 4; n = 5). Calibration bars as in figure 1B.

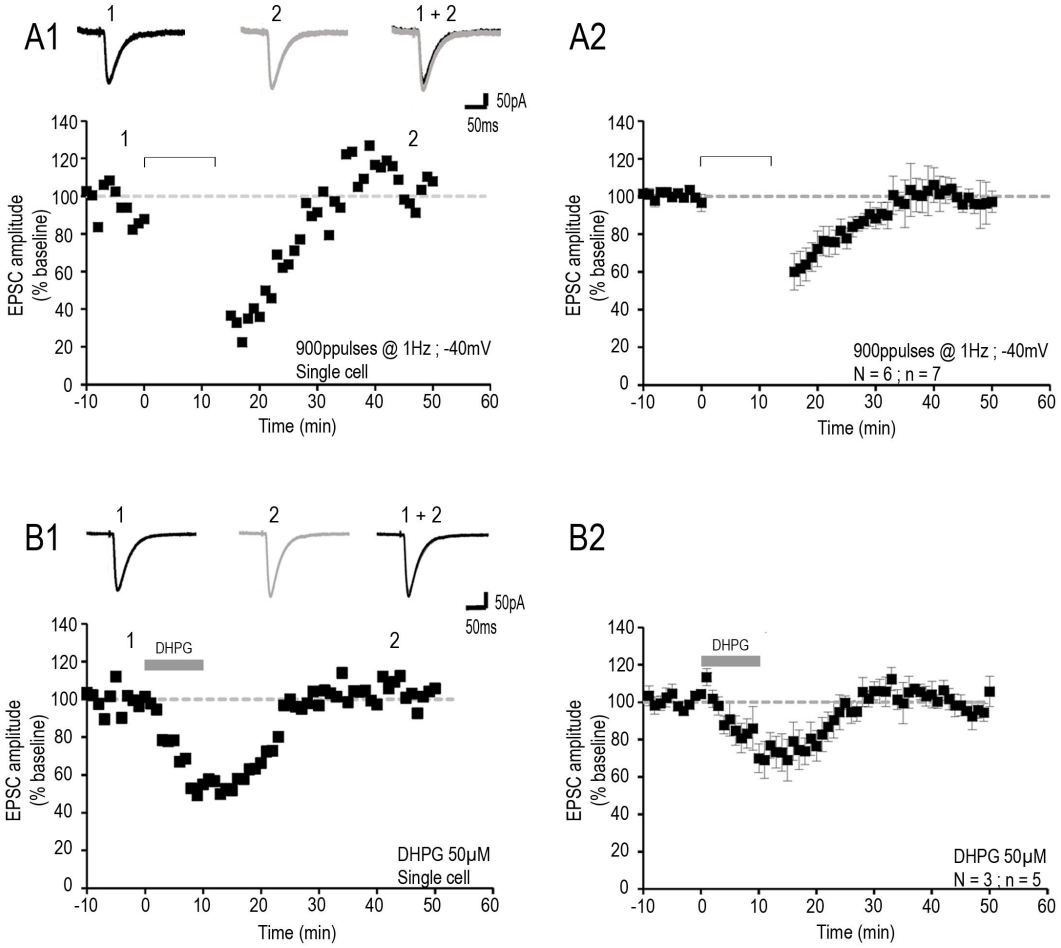
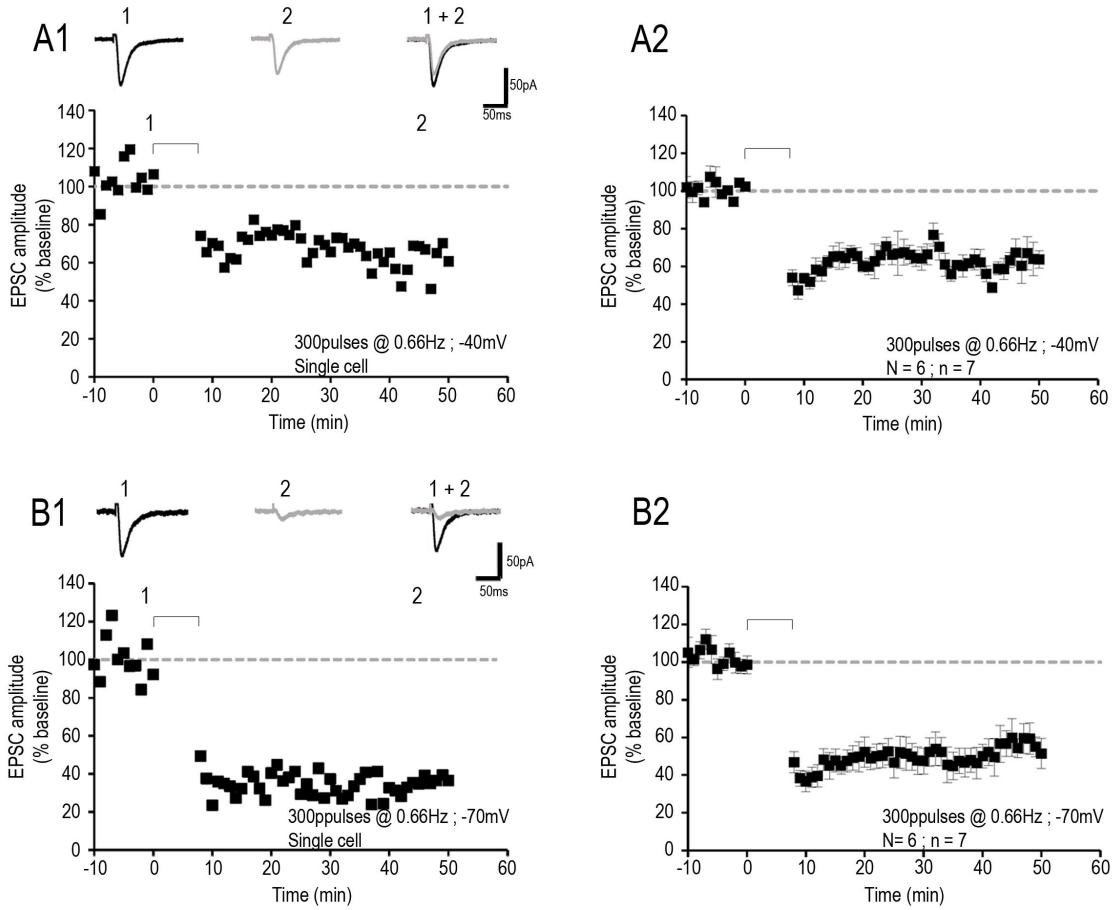
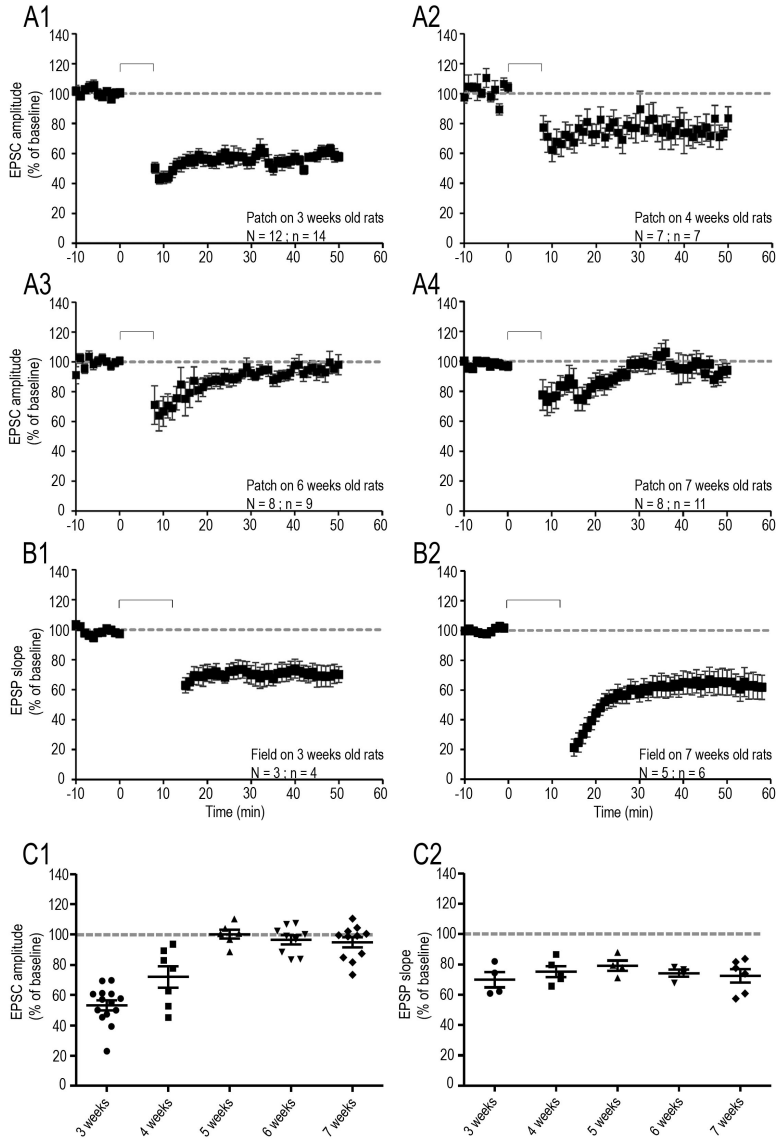


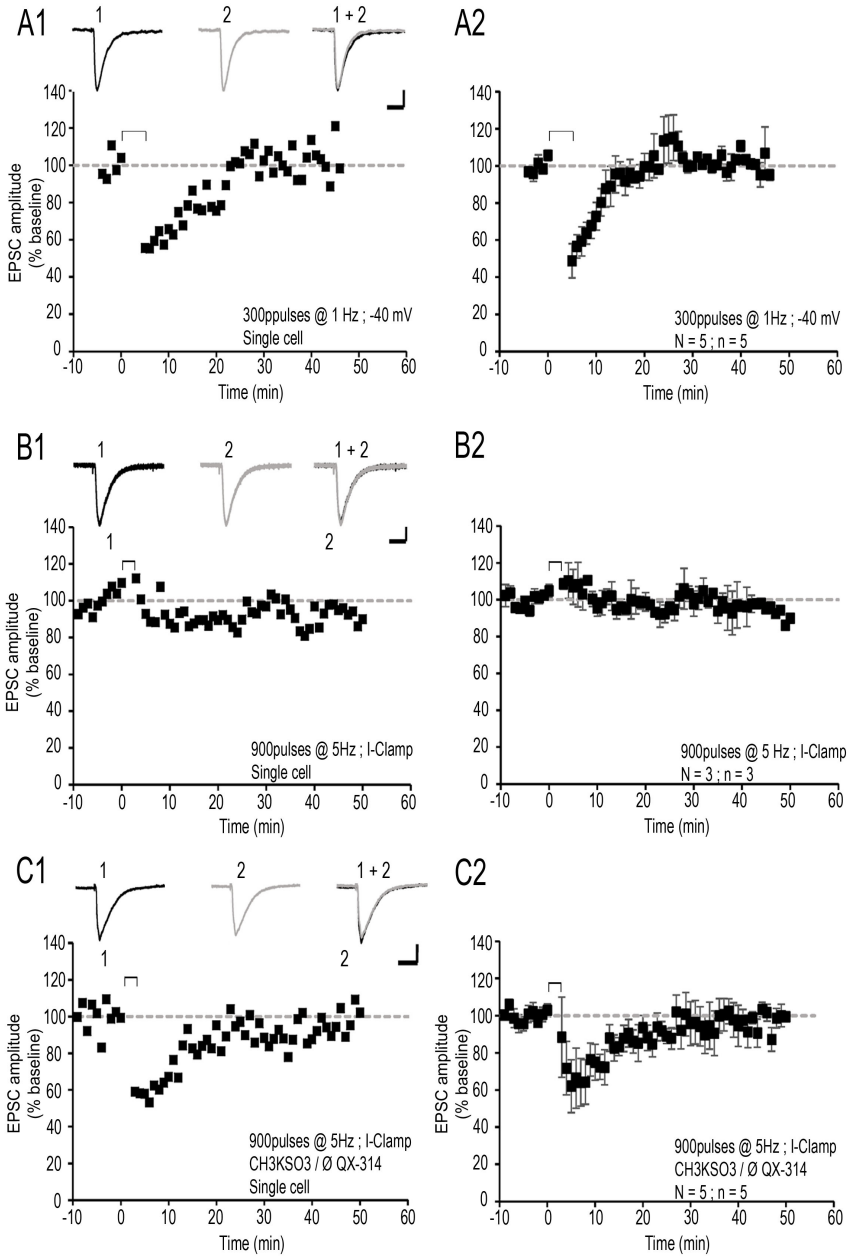
Figure 3: **No combined LTD and no chemical mGluR-LTD in hippocampal slices of adolescent (P38-45) rats with whole-cell patch-clamp recording.** Representative EPSC traces, single example **(A1)** and pooled data **(A2)** illustrating a combined NMDAR- and mGluR-LTD (N = 6; n = 7). **(B)** Representative EPSC traces, single example (**B1**) and pooled data (**B2**) illustrating an mGluR-LTD induction following bath application of 50 µM DHPG (N = 3; n = 5). Calibration bars as in figure 1B.



<u>Figure 4:</u> NMDAR- and mGluR-LTD in hippocampal slices of juvenile (P14-21) rats with whole-cell patch-clamp recordings. **(A)** Representative EPSC traces, single example (**A1**) and pooled data (**A2**) illustrating NMDAR-LTD (N = 6; n = 7). (**B**) Representative EPSC traces, single example (**B1**) and pooled data (**B2**) illustrating an mGluR-LTD (N = 6; n = 7). Calibration bars as in figure 1B.



<u>Figure 5:</u> Measurement of each type of synaptic LTD according to age and recording techniques. (A) Pooled data for whole-cell patch-clamp recordings at 3 weeks (A1: N = 12; n = 14), 4 weeks (A2: N = 7; n = 7), 6 weeks (A3: N = 8; n = 9) and 7 weeks (A4: N = 8; n = 11) old rats illustrating the progressive loss of LTD. Data are expressed as mean ± SEM of the EPSC amplitude. (**B**) Field recordings pooled data of LTD induced in 3 weeks (B1: N = 3; n = 4) and 7 weeks (B2: N = 5; n = 6) old rats. (**C**) Scatter plot illustrating the EPSCs amplitude following LTD induction with the whole-cell patch-clamp technique (**C1**) and the field recording technique (**C2**), according to the age.



<u>Figure 6:</u> Changing the recording conditions with patch-clamp to induce a combined LTD in adolescent rats. (**A**) Representative EPSC traces, single example (**A1**) and pooled data (**A2**) illustrating LTD induction within 5 min of recording (N = 5; n = 5). (**B**) Representative EPSC traces, single example (**B1**) and pooled data (**B2**) illustrating LTD induction in current-clamp mode (N = 3; n = 3). (**C**) Representative EPSC traces, single example (**C1**) and pooled data (**C2**) illustrating LTD induction in current-clamp mode without blockade of potassium and voltage-activated sodium channels (N = 5; n = 5). Calibration bars as in figure 1B.

Type of LTD	3 and 4 weeks old rats (name/frequency/Vh)	5 to 7 weeks old (name/frequency/Vh)
NMDAR-LTD	LFS300/0.66Hz/-40 mV	LFS300/0.66Hz/-40mV
mGluR-LTD Electrically-induced Chemically-induced	pLFS200-300/0.66Hz/-70mV	pLFS200-900/1Hz/-70mV DHPG 50 µM
Combined LTD		pLFS200-900/1Hz/-40mV pLFS200-300/1Hz/-40mV

Table 1: The different protocols used with patch-clamp recording to trigger either NMDAR- or mGluR-LTD according to the age of the animal.

Bibliographie

Abraham, W. C. and Williams, J. M. (2003) 'Properties and Mechanisms of LTP Maintenance', *Neuroscientist*, pp. 463–474. doi: 10.1177/1073858403259119.

Acheson, S. K., Stein, R. M. and Swartzwelder, H. S. (1998) 'Impairment of semantic and figural memory by acute ethanol: Age- dependent effects', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(7), pp. 1437–1442. doi: 10.1111/j.1530-0277.1998.tb03932.x.

Adams, M. M. *et al.* (2001) 'Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), pp. 8071–8076. doi: 10.1073/pnas.141215898.

Adams, M. M. *et al.* (2004) 'Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus', *Journal of Comparative Neurology*, 474(3), pp. 419–426. doi: 10.1002/cne.20148.

Agabio, R. *et al.* (2016) 'Sex Differences in Alcohol Use Disorder', *Current Medicinal Chemistry*. doi: 10.2174/0929867323666161202092908.

Ahmadi, A. *et al.* (2013) 'Influence of alcohol use on neural response to Go/No-Go task in college drinkers', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 38(11), pp. 2197–2208. doi: 10.1038/npp.2013.119.

Ahmadian, G. *et al.* (2004) 'Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD', *EMBO Journal*, 23(5), pp. 1040–1050. doi: 10.1038/sj.emboj.7600126.

Alaux-Cantin, S. *et al.* (2013) 'Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens', *Neuropharmacology*, 67, pp. 521–531. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.12.007.

Andersen, N. E. *et al.* (2012) 'Eye tracking, strategies, and sex differences in virtual navigation', *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier Inc., 97(1), pp. 81–89. doi: 10.1016/j.nlm.2011.09.007.

Anggono, V. and Huganir, R. L. (2012) 'Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity', *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 461–469. doi: 10.1016/j.conb.2011.12.006.

Ansari, K. I. *et al.* (2012) 'HOXC10 is overexpressed in breast cancer and transcriptionally regulated by estrogen via involvement of histone methylases MLL3 and MLL4', *Journal of Molecular Endocrinology*, 48(1), pp. 61–75. doi: 10.1530/JME-11-0078.

Arain, M. *et al.* (2013) 'Maturation of the adolescent brain', *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, pp. 449–461. doi: 10.2147/NDT.S39776.

Arias-Carrión, Ó. and Pöppel, E. (2007) 'Dopamine, learning, and reward-seeking behavior', *Acta*

Neurobiologiae Experimentalis.

Ascenzi, P., Bocedi, A. and Marino, M. (2006) 'Structure-function relationship of estrogen receptor α and β: Impact on human health', *Molecular Aspects of Medicine*, pp. 299–402. doi: 10.1016/j.mam.2006.07.001.

Babiec, W. E., Guglietta, R. and O'Dell, T. J. (2016) 'Basal levels of AMPA receptor GluA1 subunit phosphorylation at threonine 840 and serine 845 in hippocampal neurons', *Learning and Memory*, 23(4), pp. 127–133. doi: 10.1101/lm.040675.115.

Banke, T. G. *et al.* (2000) 'Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase', *Journal of Neuroscience*, 20(1), pp. 89–102. doi: 10.1523/jneurosci.20-01-00089.2000.

Barakat, R. *et al.* (2016) 'Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function', *BMB Reports*, 49(9), pp. 488–496. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.9.141.

Barha, C. K. and Galea, L. A. M. (2010) 'Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., pp. 1056–1067. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.01.006.

Barraclough, D. J., Ingram, C. D. and Brown, M. W. (1999) 'Chronic treatment with oestradiol does not alter in vitro LTP in subfield CA1 of the female rat hippocampus', *Neuropharmacology*, 38(1), pp. 65–71. doi: 10.1016/S0028-3908(98)00157-9.

Barria, A. *et al.* (1997) 'Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation', *Science*, 276(5321), pp. 2042–2045. doi: 10.1126/science.276.5321.2042.

Barrionuevo, G., Schottler, F. and Lynch, G. (1980) 'The effects of repetitive low frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus', *Life Sciences*, 27(24), pp. 2385–2391. doi: 10.1016/0024-3205(80)90509-3.

Barth, C. *et al.* (2016) 'In-vivo Dynamics of the Human Hippocampus across the Menstrual Cycle', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(April), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep32833.

Battey, R. (1873) *Normal ovariotomectomy*. Edited by Atlanta Medical and Surgical Journal 10.

Bayer, J. *et al.* (2018) 'Linear and inverted U-shaped dose-response functions describe estrogen effects on hippocampal activity in young women', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-018-03679-x.

Bear, M. F. and Malenka, R. C. (1994) 'Synaptic plasticity: LTP and LTD', *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), pp. 389–399. doi: 10.1016/0959-4388(94)90101-5.

Beck, K. D. and Luine, V. N. (2002) 'Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: Role of housing conditions', *Physiology and Behavior*, 75(5), pp. 661–673. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00670-4.

De Bellis, M. D. *et al.* (2001) 'Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence', *Cerebral Cortex*, 11(6), pp. 552–557. doi: 10.1093/cercor/11.6.552.

De Bellis, M. D. *et al.* (2005) 'Prefrontal cortex, thalamus, and cerebellar volumes in adolescents and young adults with adolescent-onset alcohol use disorders and comorbid mental disorders', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(9), pp. 1590–1600. doi: 10.1097/01.alc.0000179368.87886.76.

Bender, R. A. *et al.* (2017) *Sex-dependent regulation of aromatase-mediated synaptic plasticity in the basolateral amygdala*, *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1532-16.2016.

Bennink, H. J. T. C., Holinka, C. F. and Diczfalusy, E. (2008) 'Estetrol review : profile and potential clinical applications', 11(Suppl 1), pp. 47–58. doi: 10.1080/13697130802073425.

Berent-Spillson, A. *et al.* (2015) 'Distinct cognitive effects of estrogen and progesterone in menopausal women', *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier Ltd, 59, pp. 25–36. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.04.020.

Berlucchi, G. and Buchtel, H. A. (2009) 'Neuronal plasticity: Historical roots and evolution of meaning', in *Experimental Brain Research*, pp. 307–319. doi: 10.1007/s00221-008-1611-6.

Bevins, R. A. and Besheer, J. (2006) 'Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory"', *Nature Protocols*, 1(3), pp. 1306–1311. doi: 10.1038/nprot.2006.205.

Bhatnagar, A. S. (2007) 'The discovery and mechanism of action of letrozole', *Breast Cancer Research and Treatment*, 105(S1), pp. 7–17. doi: 10.1007/s10549-007-9696-3.

Bianchini, F. *et al.* (2018) 'Effects of oral contraceptives and natural menstrual cycling on environmental learning', *BMC Women's Health*. BMC Women's Health, 18(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12905-018-0671-4.

Bienenstock, E. L., Cooper, L. N. and Munro, P. W. (1982) 'Theory for the development of neuron selectivity: Orientation specificity and binocular interaction in visual cortex', *The Journal of Neuroscience*, 2(1), pp. 1000–1001. doi: 10.1093/aje/kwx073.

Bimonte-Nelson, H. A. *et al.* (2003) 'Ovarian Hormones and Cognition in the Aged Female Rat: I. Long-Term, but Not Short-Term, Ovariectomy Enhances Spatial Performance', *Behavioral Neuroscience*, 117(6), pp. 1395–1406. doi: 10.1037/0735-7044.117.6.1395.

Bimonte-Nelson, H. A. *et al.* (2004) 'Ovarian hormones and cognition in the aged female rat: II. Progesterone supplementation reverses the cognitive enhancing effects of ovariectomy', *Behavioral Neuroscience*, 118(4), pp. 707–714. doi: 10.1037/0735-7044.118.4.707.

Bimonte-Nelson, H. A. *et al.* (2006) 'Progesterone reverses the spatial memory enhancements initiated by tonic and cyclic oestrogen therapy in middle-aged ovariectomized female rats', *European Journal of Neuroscience*, 24(1), pp. 229–242. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04867.x.

Bisagno, V., Ferguson, D. and Luine, V. N. (2003) 'Chronic D-amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion, recognition memory, and brain monoamines', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74(4), pp. 859–867. doi: 10.1016/S0091-3057(03)00017-0.

Bliss, T. V. P. and Lømo, T. (1973) 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *The Journal of Physiology*, 232(2), pp. 331–356. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.

Bohbot, V. D. *et al.* (2017) 'Low-frequency theta oscillations in the human hippocampus during real-world and virtual navigation', *Nature Communications*, 8, pp. 1–7. doi: 10.1038/ncomms14415.

Boileau, I. *et al.* (2003) 'Alcohol Promotes Dopamine Release in the Human Nucleus Accumbens', 231(January), pp. 226–231. doi: 10.1002/syn.10226.

Bonaldi, C. and Hill, C. (2019) 'La mortalité attribuable à l'alcool en france en 2015 / alcohol-attributable mortality in france in 2015', *BEH*, BEH 5-6(5–6), pp. 97–108. Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2019/5-6/2019_5-6_2.html.

Bosch, M. *et al.* (2014) 'Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation', *Neuron*. Elsevier Inc., 82(2), pp. 444–459. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.021.

Bourtchuladze, R. *et al.* (1994) 'Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein', *Cell*, 79(1), pp. 59–68. doi: 10.1016/0092-8674(94)90400-6.

Bowman, R. E., Beck, K. D. and Luine, V. N. (2003) 'Chronic stress effects on memory: Sex differences in performance and monoaminergic activity', *Hormones and Behavior*, pp. 48–59. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00022-3.

Bozon, B. *et al.* (2003) 'MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, pp. 805–814. doi: 10.1098/rstb.2002.1224.

Bramham, C. R. and Srebro, B. (1987) 'Induction of long-term depression and potentiation by low- and high-frequency stimulation in the dentate area of the anesthetized rat: magnitude, time course and EEG', *Brain Research*, 405(1), pp. 100–107. doi: 10.1016/0006-8993(87)90994-2.

Brandt, N. and Rune, G. M. (2019) 'Sex-dependency of oestrogen-induced structural synaptic plasticity: Inhibition of aromatase versus application of estradiol in rodents', *European Journal of Neuroscience*, (July), pp. 1–12. doi: 10.1111/ejn.14541.

Brigman, J. L. *et al.* (2010) 'Loss of GluN2B-containing NMD A receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning', *Journal of Neuroscience*, 30(13), pp. 4590–4600. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010.

Broadwater, M. and Spear, L. P. (2014) 'Consequences of adolescent or adult ethanol exposure on tone and context fear retention: Effects of an acute ethanol challenge during conditioning', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(5), pp. 1454–1460. doi: 10.1111/acer.12382.

Burke, S. N. and Barnes, C. A. (2006) 'Neural plasticity in the ageing brain', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 30–40. doi: 10.1038/nrn1809.

Caldwell, L. C. *et al.* (2005) 'Gender and adolesent alcohol use disorders on bold respose to spatial working memory', *Alcohol and Alcoholism*, 40(3), pp. 194–200.

Campanella, S. *et al.* (2013) 'Increased Cortical Activity in Binge Drinkers during Working Memory Task: A Preliminary Assessment through a Functional Magnetic Resonance Imaging Study', *PLoS ONE*, 8(4), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0062260.

Carbia, C. *et al.* (2017) 'Binge drinking during adolescence and young adulthood is associated with deficits in verbal episodic memory', *PLoS ONE*, 12(2), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0171393.

Carreau, S. (2002) 'The testicular aromatase: from gene to physiological role.', *Reproductive biology*.

Carta, M. *et al.* (2014) 'Kainate receptors in the hippocampus', *European Journal of Neuroscience*, 39(11), pp. 1835–1844. doi: 10.1111/ejn.12590.

Casey, B. J., Jones, R. M. and Hare, T. A. (2008) 'The adolescent brain', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1124, pp. 111–126. doi: 10.1196/annals.1440.010.

Chamizo, V. D. *et al.* (2011) 'Gender differences in landmark learning for virtual navigation: The role of distance to a goal', *Behavioural Processes*. Elsevier B.V., 88(1), pp. 20–26. doi: 10.1016/j.beproc.2011.06.007.

Chamniansawat, S. and Chongthammakun, S. (2010) 'Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells', *Neuroscience Letters*, 470(1), pp. 49–54. doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.053.

Chesler, E. J. and Juraska, J. M. (2000) 'Acute administration of estrogen and progesterone impairs the acquisition of the spatial morris water maze in ovariectomized rats', *Hormones and Behavior*,

38(4), pp. 234–242. doi: 10.1006/hbeh.2000.1626.

Di Chiara, G. and Imperato, A. (1985) 'Ethanol Preferentially Stimulates Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Freely Moving Rats', *European Journal of Pharmacology*, 115, pp. 131–132.

Di Chiara, G. and Imperato, A. (1988) 'Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(July), pp. 5274–5278.

Chu, S. and Fuller, P. J. (1997) 'Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 132(1–2), pp. 195–199. doi: 10.1016/S0303-7207(97)00133-0.

Coleman, L. G. *et al.* (2011) 'Adolescent Binge Drinking Alters Adult Brain Neurotransmitter Gene Expression, Behavior, Brain Regional Volumes, and Neurochemistry in Mice', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(4), pp. 671–688. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01385.x.

Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R. and Yu, T. W. (2004) 'Receptor trafficking and synaptic plasticity', *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 952–962. doi: 10.1038/nrn1556.

Collingridge, G. L., Kehl, S. J. and McLennan, H. (1983) 'Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus.', *The Journal of Physiology*, 334(1), pp. 33–46. doi: 10.1113/jphysiol.1983.sp014478.

Córdoba Montoya, D. A. and Carrer, H. F. (1997) 'Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats', *Brain Research*, 778(2), pp. 430–438. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01206-7.

Corera, A. T., Doucet, G. and Fon, E. A. (2009) 'Long-term potentiation in isolated dendritic spines', *PLoS ONE*, 4(6). doi: 10.1371/journal.pone.0006021.

Corkin, S. (1984) 'Lasting Consequences of Bilateral Medial Temporal Lobectomy: Clinical Course and Experimental Findings in H.M.', *Seminars in Neurology*, 4(02), pp. 249–259. doi: 10.1055/s-2008-1041556.

Costello, E. J. *et al.* (2007) 'Pubertal maturation and the development of alcohol use and abuse', *Drug and Alcohol Dependence*, 88(SUPPL.1), pp. 50–59. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2006.12.009.

Courtney, K. E. and Polich, J. (2009) 'Binge Drinking in Young Adults: Data, Definitions, and Determinants', *Psychological Bulletin*, 135(1), pp. 142–156. doi: 10.1037/a0014414.

Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999) 'Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-α knockout mouse', *Annales d'Endocrinologie*, 60(2), pp. 143–148.

Crego, A. *et al.* (2010) 'Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task', *Drug and Alcohol Dependence*, 109(1–3), pp. 45–56. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.11.020.

Crews, F. T. *et al.* (2000) 'Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(11), pp. 1712–1723. doi: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb01973.x.

Crews, F. T. *et al.* (2006) 'Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol', *Neuroscience*, 137(2), pp. 437–445. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.090.

Cservenka, A. and Brumback, T. (2017) 'The burden of binge and heavy drinking on the brain: Effects on adolescent and young adult neural structure and function', *Frontiers in Psychology*, 8(JUN). doi: 10.3389/fpsyg.2017.01111.

Dabbs, J. M. *et al.* (1998) 'Spatial Ability, Navigation Strategy, and Geographic Knowledge Among

Men and Women', *Evolution and Human Behavior*, 19(2), pp. 89–98. doi: 10.1016/S1090-5138(97)00107-4.

Dager, A. D. *et al.* (2013) 'Influence of Alcohol Use and Family History of Alcoholism on Neural Response to Alcohol Cues in College Drinkers', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(SUPPL.1), pp. 161–171. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01879.x.

Dahlman-wright, K. *et al.* (2006) 'International Union of Pharmacology . LXIV . Estrogen Receptors', *Pharmacological Reviews*, 58(4), pp. 773–781. doi: 10.1124/pr.58.4.8.773.

Daniel, J. M. *et al.* (1997) 'Estrogen Enhances Performance of Female Rats during Acquisition of Radial Arm Maze', *Hormones and Behavior*, pp. 217–225.

Daw, M. I. *et al.* (2000) 'PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses', *Neuron*, 28(3), pp. 873–886. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00160-4.

Day, M. and Good, M. (2005) 'Ovariectomy-induced disruption of long-term synaptic depression in the hippocampal CA1 region in vivo is attenuated with chronic estrogen replacement', *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(1), pp. 13–21. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.009.

Dazzi, L. *et al.* (2007) 'Estrous cycle-dependent changes in basal and ethanol-induced activity of cortical dopaminergic neurons in the rat', *Neuropsychopharmacology*, 32(4), pp. 892–901. doi: 10.1038/sj.npp.1301150.

Deas, D. *et al.* (2002) 'Comorbid Psychiatric Factors Contributin to Adolescent Alcohol and Other Drug Use', *Alcohol Research & Health*, 26(2), pp. 116–121.

Deeb, W. *et al.* (2019) 'Fornix-Region Deep Brain Stimulation–Induced Memory Flashbacks in Alzheimer's Disease To', *The new engl and journal of medicine*, pp. 1–2.

Deisseroth, K., Bito, H. and Tsien, R. W. (1996) 'Signaling from synapse to nucleus: Postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity', *Neuron*, 16(1), pp. 89–101. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80026-4.

Delgado, J. Y. *et al.* (2007) 'NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840', *Journal of Neuroscience*, 27(48), pp. 13210–13221. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3056-07.2007.

Demeter, S., Rosene, D. L. and van Hoesen, G. W. (1985) 'Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum, and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: The structure and organization of the hippocampal commissures', *Journal of Comparative Neurology*, 233(1), pp. 30–47. doi: 10.1002/cne.902330104.

Desmond, N. L., Zhang, D. X. and Levy, W. B. (2000) 'Estradiol enhances the induction of homosynaptic long-term depression in the CA1 region of the adult, ovariectomized rat', *Neurobiology of Learning and Memory*, 73(2), pp. 180–187. doi: 10.1006/nlme.1999.3929.

Dettling, A. *et al.* (2007) 'Ethanol elimination rates in men and women in consideration of the calculated liver weight', *Alcohol*, 41(6), pp. 415–420. doi: 10.1016/j.alcohol.2007.05.003.

Doty, R. L. *et al.* (2015) 'Influences of hormone replacement therapy on olfactory and cognitive function in postmenopausal women', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc, 36(6), pp. 2053–2059. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.028.

Dozier, B. L. *et al.* (2019) 'Chronic ethanol drinking increases during the luteal menstrual cycle phase in rhesus monkeys: implication of progesterone and related neurosteroids', *Psychopharmacology*. Psychopharmacology, 236(6), pp. 1817–1828. doi: 10.1007/s00213-019-5168-9.

Drissi, I. *et al.* (2020) 'Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2', *Addiction Biology*, 25(3), pp. 1–15. doi: 10.1111/adb.12760.

Dudek, S. M. and Bear, M. F. (1992) 'Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), pp. 4363–4367. doi: 10.1073/pnas.89.10.4363.

Duff, S. J. and Hampson, E. (2001) 'A Sex Difference on a Novel Spatial Working Memory Task in Humans', *Brain and Cognition*, 47, pp. 470–493. doi: doi:10.1006/brcg.2001.1326.

Dunwiddie, T. and Lynch, G. S. (1978) 'Heterosynaptic depression: A postsynaptic correlate of long-term potentiation [31]', *J. Physiol.*, pp. 353–367. doi: 10.1038/266737a0.

Ehlers, M. D. (2000) 'Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting', *Neuron*, 28(2), pp. 511–525. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00129-X.

Elliot, L. S. *et al.* (1989) 'Ca2+/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), pp. 9564–9568. doi: 10.1073/pnas.86.23.9564.

Esser, M. B. *et al.* (2012) 'Binge drinking intensity: A comparison of two measures', *American Journal of Preventive Medicine*. Elsevier Inc., 42(6), pp. 625–629. doi: 10.1016/j.amepre.2012.03.001.

Fan, L. *et al.* (2010) 'Estradiol-induced object memory consolidation in middle-aged female mice requires dorsal hippocampal extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation', *Journal of Neuroscience*, 30(12), pp. 4390–4400. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4333-09.2010.

Fernandes, L. M. P. *et al.* (2018) 'Repeated Cycles of Binge-Like Ethanol Exposure Induce Immediate and Delayed Neurobehavioral Changes and Hippocampal Dysfunction in Adolescent Female Rats', *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.007.

Fernandez, S. M. *et al.* (2008) 'Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors', *Journal of Neuroscience*, 28(35), pp. 8660–8667. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1968-08.2008.

Fernandez, S. M. and Frick, K. M. (2004) 'Chronic oral estrogen affects memory and neurochemistry in middle-aged female mice', *Behavioral Neuroscience*, 118(6), pp. 1340–1351. doi: 10.1037/0735-7044.118.6.1340.

Fester, L. *et al.* (2012) 'Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: Sexual dimorphism in vivo but not in vitro', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, pp. 24–29. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.11.010.

Fischer, G. *et al.* (1997) 'Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D- aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.

Fiuza, M. *et al.* (2017) 'PICK1 regulates AMPA receptor endocytosis via direct interactions with AP2 α-appendage and dynamin', *Journal of Cell Biology*, 216(10), pp. 3323–3338. doi: 10.1083/jcb.201701034.

Ford, M. M., Eldridge, J. C. and Samson, H. H. (2002) 'Ethanol consumption in the female Long-Evans rat: A modulatory role of estradiol', *Alcohol*, 26(2), pp. 103–113. doi: 10.1016/S0741-8329(01)00203-8.

Forger, N. G. and Morin, L. P. (1982) 'Reproductive State Modulates Ethanol Intake in Rats: Effects of

Ovariectomy, Ethanol Concentration, Estrous Cycle and Pregnancy', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 17, pp. 323–331.

Fortress, A. M. *et al.* (2013) 'Estradiol-induced object recognition memory consolidation is dependent on activation of mTOR signaling in the dorsal hippocampus', *Learning and Memory*, 20(3), pp. 147–155. doi: 10.1101/lm.026732.112.

Fosbery, W. (1897) *Severe climacteric flushings successfully treated by ovarian extract*. Edited by B. M. J.

Foster, T. C. *et al.* (1991) 'Increase in perforant path quantal size in aged F-344 rats', *Neurobiology of Aging*, 12(5), pp. 441–448. doi: 10.1016/0197-4580(91)90071-Q.

Fox, C. J. *et al.* (2007) 'Tyrosine Phosphorylation of the GluR2 Subunit Is Required for Long-Term Depression of Synaptic Efficacy in Young Animals In Vivo', *Hippocampus*, 17, pp. 600–605. doi: 10.1002/hipo.20302.

Foy, M. R., Akopian, G. and Thompson, R. F. (2008) 'Progesterone Regulation of Synaptic Transmission and plasticity in Rodent Hippocampus', *Learning and Memory*. doi: 10.1101/lm.1124708.

France, G. *et al.* (2017) 'Multiple roles of GluN2B-containing NMDA receptors in synaptic plasticity in juvenile hippocampus', *Neuropharmacology*, 112, pp. 76–83. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.010.

Freeman, E. *et al.* (1992) 'A placebo-controlled study of effects of oral progesterone on performance and mood.', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 33(3), pp. 293–298. doi: 10.1111/j.1365-2125.1992.tb04038.x.

Frezza, M. *et al.* (1990) 'The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism', *The New England Journal of Medicine*, 323(22), pp. 1517–1522. doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.10.018.

Frick, K. M. (2012) 'Building a better hormone therapy?: How understanding the rapid effects of sex steroid hormones could lead to new therapeutics for age-related memory decline', *Behavioral Neuroscience*, 126(1), pp. 29–53. doi: 10.1037/a0026660.

Froestl, W. (2011) 'An historical perspective on GABAergic drugs', *Future Medicinal Chemistry*, 3(2), pp. 163–175. doi: 10.4155/fmc.10.285.

Frye, C. A. and Sturgis, J. D. (1995) 'Neurosteroids affect spatial/reference, working, and long-term memory of female rats', *Neurobiology of Learning and Memory*, pp. 83–96. doi: 10.1006/nlme.1995.1046.

Frye, C. A. and Walf, A. A. (2008) 'Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks', *Neuroscience Letters*, 437(2), pp. 116–120. doi: 10.1016/j.neulet.2008.04.004.

Fuhrmann, D., Knoll, L. J. and Blakemore, S. J. (2015) 'Adolescence as a Sensitive Period of Brain Development', *Trends in Cognitive Sciences*. Elsevier Ltd, 19(10), pp. 558–566. doi: 10.1016/j.tics.2015.07.008.

Fujishima, M. *et al.* (2014) 'Mild cognitive impairment, poor episodic memory, and late-life depression are associated with cerebral cortical thinning and increased white matter hyperintensities', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(OCT), pp. 1–12. doi: 10.3389/fnagi.2014.00306.

Gabor, C. *et al.* (2015) 'Rapid effects of the G-protein coupled oestrogen receptor (GPER) on learning and dorsal hippocampus dendritic spines in female mice', *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc., 149, pp. 53–60. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.05.017.

Galea, L. A. M. *et al.* (2001) 'High levels of estradiol disrupt conditioned place preference learning, stimulus response learning and reference memory but have limited effects on working memory', *Behavioural Brain Research*, 126(1–2), pp. 115–126. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00255-8.

Galvin, C. and Ninan, I. (2014) 'Regulation of the mouse medial prefrontal cortical synapses by endogenous estradiol', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 39(9), pp. 2086–2094. doi: 10.1038/npp.2014.56.

Gassmann, M. and Bettler, B. (2012) 'Regulation of neuronal GABAB receptor functions by subunit composition', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 380–394. doi: 10.1038/nrn3249.

Ge, Y. *et al.* (2010) 'Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38), pp. 16697–16702. doi: 10.1073/pnas.1008200107.

Gholizadeh, S., Sadatmahalleh, S. J. and Ziaei, S. (2018) 'The association between estradiol levels and cognitive function in postmenopausal women', *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 16(7), pp. 455–458. doi: 10.29252/ijrm.16.7.455.

Gibbs, R. B. (2000) 'Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats', *Neurobiology of Aging*, 21(1), pp. 107–116. doi: 10.1016/S0197-4580(00)00103-2.

Gierski, F. *et al.* (2017a) 'Cloninger's Temperament and Character Dimensions of Personality and Binge Drinking Among College Students', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(11), pp. 1970–1979. doi: 10.1111/acer.13497.

Gierski, F. *et al.* (2017b) 'Cloninger's Temperament and Character Dimensions of Personality and Binge Drinking Among College Students', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(11), pp. 1970–1979. doi: 10.1111/ acer.13497.

Giese, K. P. and Mizuno, K. (2013) 'The roles of protein kinases in learning and memory', *Learning and Memory*, pp. 540–552. doi: 10.1101/lm.028449.112.

Gil-Hernandez, S. *et al.* (2017) 'Alcohol binge drinking and executive functioning during adolescent brain development', *Frontiers in Psychology*, 8(OCT), pp. 1–12. doi: 10.3389/fpsyg.2017.01638.

Gillies, G. E. and McArthur, S. (2010) 'Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: A case for sex-specific medicines', *Pharmacological Reviews*, pp. 155–198. doi: 10.1124/pr.109.002071.

Goddings, A. L. *et al.* (2019) 'Understanding the Role of Puberty in Structural and Functional Development of the Adolescent Brain', *Journal of Research on Adolescence*, pp. 32–53. doi: 10.1111/jora.12408.

Gogos, A. (2013) 'Natural and synthetic sex hormones: Effects on higher-order cognitive function and prepulse inhibition', *Biological Psychology*. Elsevier B.V., 93(1), pp. 17–23. doi: 10.1016/j.biopsycho.2013.02.001.

González-Burgos, I. *et al.* (2012) 'Selective estrogen receptor modulators regulate dendritic spine plasticity in the hippocampus of male rats', *Neural Plasticity*, 2012. doi: 10.1155/2012/309494.

Gonzalez, V. M. (2012) 'Association of solitary binge drinking and suicidal behavior among emerging adult college students', *Psychology of Addictive Behaviors*, 26(3), pp. 609–614. doi: 10.1037/a0026916.

Good, M., Day, M. and Muir, J. L. (1999) 'Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen

modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region', *European Journal of Neuroscience*, 11(12), pp. 4476–4480. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00920.x.

Gorski, R. A. (1973) 'Perinatal Effects of Sex Steroids on Brain Development and Function', *Progress in Brain Research*, 39(C), pp. 149–163. doi: 10.1016/S0079-6123(08)64073-X.

Goto, M. *et al.* (2011) 'Entorhinal cortex volume measured with 3T MRI is positively correlated with the Wechsler Memory Scale-Revised logical/verbal memory score for healthy subjects', *Neuroradiology*, 53(8), pp. 617–622. doi: 10.1007/s00234-011-0863-1.

Gould, E. *et al.* (1990) 'Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood', *Journal of Neuroscience*, 10(4), pp. 1286–1291. doi: 10.1523/jneurosci.10-04-01286.1990.

Graham, D. J. and Clarke, C. L. (1997) 'Physiological action of progesterone in target tissues', *Endocrine Reviews*, 18(4), pp. 502–519. doi: 10.1210/er.18.4.502.

Grassi, S. *et al.* (2011) 'Neural 17β-estradiol facilitates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region', *Neuroscience*. Elsevier Inc., 192, pp. 67–73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.078.

Gresack, J. E. and Frick, K. M. (2006) 'Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84(1), pp. 112–119. doi: 10.1016/j.pbb.2006.04.013.

Grissom, E. M. *et al.* (2013) 'Biological sex influences learning strategy preference and muscarinic receptor binding in specific brain regions of prepubertal rats', *Hippocampus*, 23(4), pp. 313–322. doi: 10.1002/hipo.22085.

Guerriero, G. (2009) 'Vertebrate sex steroid receptors: Evolution, ligands, and neurodistribution', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, pp. 154–168. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04460.x.

Gupta, R. R. *et al.* (2001) 'Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats', *Brain Research*, 888(2), pp. 356–365. doi: 10.1016/S0006-8993(00)03116-4.

Häggström, M. and Richfield, D. (2014) 'Diagram of the pathways of human steroidogenesis', *WikiJournal of Medicine*, 1(1), pp. 2–6. doi: 10.15347/wjm/2014.005.

Haim, S. *et al.* (2003) 'Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5-day estrous cycles in Fischer 344 rats and their stimulation in ovariectomized females', *Journal of Endocrinological Investigation*, 26(10), pp. 1013–1022. doi: 10.1007/BF03348201.

Hampson, E. (1990a) 'Estrogen-related variations in human spatial and articulatory-motor skills', *Psychoneuroendocrinology*, 15(2), pp. 97–111. doi: 10.1016/0306-4530(90)90018-5.

Hampson, E. (1990b) 'Variations in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle', *Brain and Cognition*, 14(1), pp. 26–43. doi: 10.1016/0278-2626(90)90058-V.

Hanson, K. L. *et al.* (2011) 'Impact of Adolescent Alcohol and Drug Use on Neuropsychological Functioning in Young Adulthood:10-year Outcomes', *Journal of Child and Adolescent Substance Abuse*, 20(2), pp. 135–154. doi: 10.1080/1067828X.2011.555272.

Harburger, L. L., Bennett, J. C. and Frick, K. M. (2007) 'Effects of estrogen and progesterone on spatial memory consolidation in aged females', *Neurobiology of Aging*, 28(4), pp. 602–610. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.019.

Hasegawa, Y. *et al.* (2015) 'Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks', *Brain Research*. Elsevier, 1621, pp. 147–161. doi:

10.1016/j.brainres.2014.12.056.

Haut, J. S. *et al.* (1989) 'Gender differences in retrieval from long-term memory following acute intoxication with ethanol', *Physiology and Behavior*, 45(6), pp. 1161–1165. doi: 10.1016/0031-9384(89)90103-0.

Hawkins, M. B. *et al.* (2000) 'Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), pp. 10751–10756. doi: 10.1073/pnas.97.20.10751.

Hawley, W. R. *et al.* (2012) 'The effects of biological sex and gonadal hormones on learning strategy in adult rats', *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc., 105(4), pp. 1014–1020. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.11.021.

Hawley, W. R. *et al.* (2014) 'Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats', *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V., 262, pp. 68–73. doi: 10.1016/j.bbr.2014.01.006.

Hayashi, T. and Huganir, R. L. (2004) 'Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by Src family tyrosine kinases', *Journal of Neuroscience*, 24(27), pp. 6152–6160. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0799-04.2004.

Haywood, S. A. *et al.* (1999) 'Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle', *Endocrinology*, 140(7), pp. 3255–3263. doi: 10.1210/endo.140.7.6869.

Hazell, G. G. J. *et al.* (2009) 'Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues', *Journal of Endocrinology*, 202(2), pp. 223–236. doi: 10.1677/JOE-09-0066.

He, K. *et al.* (2009) 'Stabilization of Ca2+-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), pp. 20033–20038. doi: 10.1073/pnas.0910338106.

Hebb, D. O. (1949) *The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory*. Wiley.

Hee Jung Chung *et al.* (2000) 'Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins', *Journal of Neuroscience*, 20(19), pp. 7258–7267. doi: 10.1523/jneurosci.20-19-07258.2000.

Heffernan, T. *et al.* (2010) 'Does binge drinking in teenagers affect their everyday prospective memory?', *Drug and Alcohol Dependence*. Elsevier Ireland Ltd, 109(1–3), pp. 73–78. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.12.013.

Hendricson, A. W. *et al.* (2002) 'Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), pp. 938–944. doi: 10.1124/jpet.301.3.938.

Henson, M. A. *et al.* (2010) 'Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions', *Progress in Neurobiology*, 91(1), pp. 23–37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.01.004.

Hermens, D. F. and Lagopoulos, J. (2018) 'Binge drinking and the young brain: A mini review of the neurobiological underpinnings of alcohol-induced blackout', *Frontiers in Psychology*, pp. 1–7. doi: 10.3389/fpsyg.2018.00012.

Heynen, A. J., Abraham, W. C. and Bear, M. F. (1996) 'Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo', *Nature*, 381(6578), pp. 163–166. doi: 10.1038/381163a0.

Hilderbrand, E. R. and Lasek, A. W. (2018) 'Estradiol enhances ethanol reward in female mice through

activation of ERα and ERβ', *Hormones and Behavior*, 98(312), pp. 159–164. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.01.001.

Hileman, S. M., Handa, R. and Jackson, G. L. (1999) 'Distribution of Estrogen Receptor-B Messenger Ribonucleic Acid in the Male Sheep HypothalamusJ', *Biology of Reproduction*, 60, pp. 1279–1284.

Hingson, R. W., Heeren, T. and Winter, M. R. (2006) 'Age at drinking onset and alcohol dependence: Age at onset, duration, and severity', *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 160(7), pp. 739–746. doi: 10.1001/archpedi.160.7.739.

Hingson, R. W., Zha, W. and White, A. M. (2017) 'Drinking Beyond the Binge Threshold: Predictors, Consequences, and Changes in the U.S.', *American Journal of Preventive Medicine*. Elsevier Inc., 52(6), pp. 717–727. doi: 10.1016/j.amepre.2017.02.014.

Hojo, Y. *et al.* (2004) 'Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017α and P450 aromatase localized in neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp. 865–870. doi: 10.1073/pnas.2630225100.

Hojo, Y. *et al.* (2008) 'Estrogen synthesis in the brain-Role in synaptic plasticity and memory', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), pp. 31–43. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.017.

Holmes, M. M., Wide, J. K. and Galea, L. A. M. (2002) 'Low levels of estradiol facilitate, whereas high levels of estradiol impair, working memory performance on the radial arm maze', *Behavioral Neuroscience*, 116(5), pp. 928–934. doi: 10.1037/0735-7044.116.5.928.

Honjo, H. *et al.* (2005) 'Progestins and estrogens and Alzheimer's disease', in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 305–308. doi: 10.1016/j.jsbmb.2004.12.001.

Howell, N. A. *et al.* (2013) 'Increased Ventral Striatal Volume in College-Aged Binge Drinkers', *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0074164.

Hu, S. *et al.* (2013) 'Volumetric analysis of medial temporal lobe structures in brain development from childhood to adolescence', *NeuroImage*. Elsevier Inc., 74, pp. 276–287. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.02.032.

Huang, G. Z. and Woolley, C. S. (2012) 'Estradiol Acutely Suppresses Inhibition in the Hippocampus through a Sex-Specific Endocannabinoid and mGluR-Dependent Mechanism', *Neuron*. Elsevier Inc., 74(5), pp. 801–808. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.035.

Hubscher, C., Brooks, D. and Johnson, J. (2005) 'A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle', *Biotechnic & Histochemistry*, 80(2), pp. 79–87. doi: 10.1080/10520290500138422.

Huerta, P. T. and Lisman, J. E. (1995) 'Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro', *Neuron*. doi: 10.1016/0896-6273(95)90094-2.

Huganir, R. L. and Nicoll, R. A. (2013) 'AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years', *Neuron*. Elsevier Inc., pp. 704–717. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.025.

Humphreys, G. I., Ziegler, Y. S. and Nardulli, A. M. (2014) '17B-Estradiol Modulates Gene Expression in the Female Mouse Cerebral Cortex', *PLoS ONE*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0111975.

Iaria, G. *et al.* (2003) 'Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate nucleus in human navigation: Variability and change with practice', *Journal of Neuroscience*, 23(13), pp. 5945–5952. doi: 10.1523/jneurosci.23-13-05945.2003.

Inagaki, T., Gautreaux, C. and Luine, V. (2010) 'Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas', *Hormones and Behavior*, 58(3), pp. 415–426. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.013.

Insel, T. R., Miller, L. P. and Gelhard, R. E. (1990) 'The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain-I. N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate receptors', *Neuroscience*, 35(1), pp. 31–43. doi: 10.1016/0306-4522(90)90118-N.

Ishunina, T. A., Fischer, D. F. and Swaab, D. F. (2007) 'Estrogen receptor α and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease', *Neurobiology of Aging*, 28(11), pp. 1670–1681. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.07.024.

Jacobus, J. *et al.* (2009) 'White matter integrity in adolescents with histories of marijuana use and binge drinking', *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier B.V., 31(6), pp. 349–355. doi: 10.1016/j.ntt.2009.07.006.

Jacobus, J. and Tapert, S. F. (2013) 'Neurotoxic Effects of Alcohol in Adolescence', *Annual Review of Clinical Psychology*, 9(1), pp. 703–721. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-050212-185610.

Jacome, L. F. *et al.* (2010) 'Estradiol and ERβ agonists enhance recognition memory, and DPN, an ERβ agonist, alters brain monoamines', *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier Inc., 94(4), pp. 488–498. doi: 10.1016/j.nlm.2010.08.016.

Jain, A., Huang, G. Z. and Woolley, C. S. (2019) 'Latent sex differences in molecular signaling that underlies excitatory synaptic potentiation in the hippocampus', *Journal of Neuroscience*, 39(9), pp. 1552–1565. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1897-18.2018.

Jang, M. H. *et al.* (2002) 'Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus', *NeuroReport*, 13(12), pp. 1509–1513. doi: 10.1097/00001756-200208270-00004.

Jenkins, M. A. *et al.* (2014) 'Regulation of GluA1 α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor function by protein kinase C at serine-818 and threonine-840', *Molecular Pharmacology*, 85(4), pp. 618–629. doi: 10.1124/mol.113.091488.

Jennison, K. M. and Johnson, K. A. (1994) 'Drinking-induced blackouts among Young adults: Results from a national longitudinal study', *Substance Use and Misuse*, 29(1), pp. 23–51. doi: 10.3109/10826089409047367.

Jurado, S., Biou, V. and Malenka, R. C. (2010) 'A calcineurin/AKAP complex is required for NMDA receptor-dependent long-term depression', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 1053–1055. doi: 10.1038/nn.2613.

Kalinowski, A. and Humphreys, K. (2016) 'Governmental standard drink definitions and low-risk alcohol consumption guidelines in 37 countries', *Addiction*, 111(7), pp. 1293–1298. doi: 10.1111/add.13341.

Kastenberger, I. and Schwarzer, C. (2014) 'GPER1 (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner', *Hormones and Behavior*. Elsevier B.V., 66(4), pp. 628–636. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.09.001.

Katsuki, H., Izumi, Y. and Zorumski, C. F. (1997) 'Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region', *Journal of Neurophysiology*. doi: 10.1152/jn.1997.77.6.3013.

Keeley, R. J. *et al.* (2013) 'Sex Difference in Cue Strategy in a Modified Version of the Morris Water Task: Correlations between Brain and Behaviour', *PLoS ONE*, 8(7), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0069727.

Kemp, N. *et al.* (2000) 'Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: Role of age and stimulus protocol', *European Journal of Neuroscience*, 12(1), pp. 360–366. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00903.x.

Kerns, K. A. and Berenbaum, S. A. (1991) 'Sex differences in spatial ability in children', *Behavior*

Genetics, 21(4), pp. 383–396. doi: 10.1007/BF01065974.

Khan, U. A. *et al.* (2014) 'Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease', *Nature Neuroscience*, 17(2), pp. 304–311. doi: 10.1038/nn.3606.

Kim, E. J., Pellman, B. and Kim, J. J. (2015) 'Stress effects on the hippocampus: A critical review', *Learning and Memory*, pp. 411–416. doi: 10.1101/lm.037291.114.

Kimura, D. and Galea, L. A. M. (1993) 'Sex differences in route-learning', *Personality and Individual Differences*, 14(1), pp. 53–65.

Knauer, E. (1898) *Transplantation of the ovaries : an experimental study*. Edited by H. z Archiv.f Gyn Bd. 1x.

Konorski, J. (1948) *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge University Press.

Korol, D. L. *et al.* (2004) 'Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats', *Hormones and Behavior*, 45(5), pp. 330–338. doi: 10.1016/j.yhbeh.2004.01.005.

Kosaka, T. and Hama, K. (1985) 'Gap junctions between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions): A combined Golgi-electron microscopy study', *Journal of Comparative Neurology*, 231(2), pp. 150–161. doi: 10.1002/cne.902310203.

Kramár, E. A. *et al.* (2009) 'Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity', *Journal of Neuroscience*, 29(41), pp. 12982–12993. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3059-09.2009.

Kristjansson, A. L., Sigfusdottir, I. D. and Allegrante, J. P. (2013) 'Adolescent substance use and peer use: A multilevel analysis of cross-sectional population data', *Substance Abuse: Treatment, Prevention, and Policy*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1747-597X-8-27.

Kuhlmann, S. and Wolf, O. T. (2005) 'Cortisol and memory retrieval in women: Influence of menstrual cycle and oral contraceptives', *Psychopharmacology*, 183(1), pp. 65–71. doi: 10.1007/s00213-005-0143-z.

Kumar, V. *et al.* (1987) 'Functional domains of the human androgen receptor', *Cell.*, 51, pp. 941–951.

Kuntsche, E. *et al.* (2017) 'Binge drinking : Health impact , prevalence , correlates and interventions', *Psychology & Health*. Routledge, 0446(May), p. 0. doi: 10.1080/08870446.2017.1325889.

Kuroki, Y. *et al.* (2000) 'Putative membrane-bound estrogen receptors possibly stimulate mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus', *European Journal of Pharmacology*, 400(2–3), pp. 205–209. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00425-8.

Kvamme, T. L. *et al.* (2016) 'Sexually dimorphic brain volume interaction in college-aged binge drinkers', *NeuroImage: Clinical*. The Authors, 10, pp. 310–317. doi: 10.1016/j.nicl.2015.12.004.

Laflamme, N. *et al.* (1998) 'Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER alpha and ER beta) throughout the rat brain', *Journal of Neurobiology*, 36, pp. 357–378.

Lashley, K. S. (1924) 'The theory that synaptic resistance is reduced by the passage of the nerve impulse', in *Studies of cerebral function in learning*. Psychol Rev, pp. 369–375.

Lawton, C. A. (1994) 'Gender differences in way-finding strategies: Relationship to spatial ability and spatial anxiety', *Sex Roles*, 30(11–12), pp. 765–779. doi: 10.1007/BF01544230.

Lee, H. *et al.* (2000) 'Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity', *Nature*, 405(June), pp. 955–959.

Lee, H. K. *et al.* (1998) 'NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus', *Neuron*, 21(5), pp. 1151–1162. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80632-7.

Lee, H. K. *et al.* (2003) 'Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory', *Cell*, 112(5), pp. 631–643. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00122-3.

Lee, H. K. *et al.* (2007) 'Identification and characterization of a novel phosphorylation site on the GluR1 subunit of AMPA receptors', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 36(1), pp. 86–94. doi: 10.1016/j.mcn.2007.06.003.

Lee, H. K. *et al.* (2010) 'Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus', *Journal of Neurophysiology*, 103(1), pp. 479–489. doi: 10.1152/jn.00835.2009.

Lee, H. K. and Huganir, R. L. (2007) 'AMPA receptor regulation and the reversal of synaptic plasticity - LTP, LTD, depotentiation, and dedepression', in *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, pp. 633–648. doi: 10.1016/B978-012370509-9.00035-8.

Leplus, A. *et al.* (2019) 'Chronic fornix deep brain stimulation in a transgenic Alzheimer's rat model reduces amyloid burden, inflammation, and neuronal loss', *Brain Structure and Function*. Springer Berlin Heidelberg, 224(1), pp. 363–372. doi: 10.1007/s00429-018-1779-x.

Levy, W. B. and Steward, O. (1979) 'Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation', *Brain Research*, 175(2), pp. 233–245. doi: 10.1016/0006-8993(79)91003-5.

Lewis, M. C., Orr, P. T. and Frick, K. M. (2008) 'Differential effects of acute progesterone administration on spatial and object memory in middle-aged and aged female C57BL/6 mice', *Hormones and Behavior*, 54(3), pp. 455–462. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.05.010.

Li, J. *et al.* (2016) 'A microsomal based method to detect aromatase activity in different brain regions of the rat using ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 163(2015), pp. 113–120. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.04.013.

Lichtenfels, M. *et al.* (2017) 'The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha', *Journal of Neural Transmission*. Springer Vienna, 124(11), pp. 1331–1339. doi: 10.1007/s00702-017-1785-9.

Lin, J. W. *et al.* (2000) 'Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization', *Nature Neuroscience*, 3(12), pp. 1282–1290. doi: 10.1038/81814.

Lisdahl, K. M. *et al.* (2013) 'Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents', *Psychiatry Research - Neuroimaging*. Elsevier, 211(1), pp. 17–23. doi: 10.1016/j.pscychresns.2012.07.009.

Lisman, J., Yasuda, R. and Raghavachari, S. (2012) 'Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 169–182. doi: 10.1038/nrn3192.

Liu, F. *et al.* (2008) 'Activation of estrogen receptor-β regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory', *Nature Neuroscience*, 11(3), pp. 334–343. doi: 10.1038/nn2057.

Liu, L. *et al.* (2018) 'Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting', *Journal of Archaeological Science: Reports*. Elsevier, 21(May), pp. 783–793. doi: 10.1016/j.jasrep.2018.08.008.

Liu, M. *et al.* (2019) 'Letrozole induces worse hippocampal synaptic and dendritic changes and spatial memory impairment than ovariectomy in adult female mice', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 706(December 2018), pp. 61–67. doi: 10.1016/j.neulet.2019.05.006.

Liu, X. B., Murray, K. D. and Jones, E. G. (2004) 'Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development', *Journal of Neuroscience*, 24(40), pp. 8885–8895. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2476-04.2004.

Lomeli, H. *et al.* (1993) 'The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family', *FEBS Letters*, 315(3), pp. 318–322. doi: 10.1016/0014-5793(93)81186-4.

López Mendoza, A., Bravo Durán, D. A. and Silva Gómez, A. B. (2018) 'Increased dendritic length in CA1 and CA3 hippocampal neurons during the metestrus phase in Wistar rats', *Brain Research*, 1682, pp. 78–83. doi: 10.1016/j.brainres.2018.01.008.

Loy, R., Gerlach, J. L. and McEwen, B. S. (1988) 'Autoradiographic localization of estradiol-binding neurons in the rat hippocampal formation and entorhinal cortex', in *Developmental Brain Research*, pp. 245–251.

Lu, Y. *et al.* (2019) 'Neuron-derived estrogen regulates synaptic plasticity and memory', *Journal of Neuroscience*, 39(15), pp. 2792–2809. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1970-18.2019.

Luine, V. N., Jacome, L. F. and Maclusky, N. J. (2003) 'Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats', *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2003-0004.

Luine, V. and Rodriguez, M. (1994) 'Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats', *Behavioral and Neural Biology*, 62(3), pp. 230–236. doi: 10.1016/S0163-1047(05)80021-4.

Lund, E. and Jacobsen, B. K. (1990) 'Use of oral contraceptives in relation to dietary habits and alcohol consumption', *Contraception*, 42(2), pp. 171–177. doi: 10.1016/0010-7824(90)90100-A.

Lüthi, A. *et al.* (2004) 'Bi-directional modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity', *BMC Neuroscience*, 5, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2202-5-44.

Lydon, J. P. *et al.* (1995) 'Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities', *Genes and Development*, 9(18), pp. 2266–2278. doi: 10.1101/gad.9.18.2266.

Lymer, J. M. *et al.* (2018) 'Estrogens and their receptors in the medial amygdala rapidly facilitate social recognition in female mice', *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier, 89(August 2017), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.12.021.

Lynch, G. *et al.* (1983) 'Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation', *Nature*, 305(October), pp. 719–721.

Lynch, G. S., Dunwiddie, T. and Gribkoff, V. (1977) 'Heterosynaptic depression: A postsynaptic correlate of long-term potentiation [31]', *Nature*, pp. 737–739. doi: 10.1038/266737a0.

Ma, C. H., Dong, K. W. and Yu, K. L. (2000) 'cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor β-subtype in goldfish (Carassius auratus)', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1490(1–2), pp. 145–152. doi: 10.1016/S0167-4781(99)00235-3.

Maass, A. *et al.* (2014) 'Laminar activity in the hippocampus and entorhinal cortex related to novelty and episodic encoding', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms6547.

MacLusky, N. J. *et al.* (2005) 'The 17α and 17β isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the Ca1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats', *Endocrinology*, 146(1), pp. 287–293. doi: 10.1210/en.2004-0730.

Maguire, E. A. *et al.* (1998) 'Knowing Where and Getting There: a Human Navigation Network',

Science (New York, N.Y.), 280(May), pp. 0–3.

Mahesh, V. B., Brann, D. W. and Hendry, L. B. (1996) 'Diverse modes of action of progesterone and its metabolites', in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 209–219. doi: 10.1016/0960-0760(95)00238-3.

Maki, P. M., Rich, J. B. and Shayna Rosenbaum, R. (2002) 'Implicit memory varies across the menstrual cycle: Estrogen effects in young women', *Neuropsychologia*, 40(5), pp. 518–529. doi: 10.1016/S0028-3932(01)00126-9.

Maki, P. M., Zonderman, A. B. and Resnick, S. M. (2001) 'Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone-replacement therapy', *American Journal of Psychiatry*, 158(2), pp. 227–233. doi: 10.1176/appi.ajp.158.2.227.

Maldonado-Devincci, A. M. *et al.* (2010) 'Repeated binge ethanol administration during adolescence enhances voluntary sweetened ethanol intake in young adulthood in male and female rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier B.V., 96(4), pp. 476–487. doi: 10.1016/j.pbb.2010.07.008.

Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1997) 'Never fear, LTP is hear', *Nature*, pp. 552–553. doi: 10.1038/37472.

Mameli, M. *et al.* (2005) 'Developmentally regulated actions of alcohol on hippocampal glutamatergic transmission', *Journal of Neuroscience*, 25(35), pp. 8027–8036. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2434-05.2005.

Man, H. Y. *et al.* (2000) 'Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization', *Neuron*, 25(3), pp. 649–662. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81067-3.

Manahan-Vaughan, D. (1997) 'Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats', *Journal of Neuroscience*, 17(9), pp. 3303–3311. doi: 10.1523/jneurosci.17-09-03303.1997.

Maren, S., De Oca, B. and Fanselow, M. S. (1994) 'Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning', *Brain Research*, 661(1–2), pp. 25–34. doi: 10.1016/0006-8993(94)91176-2.

Markwiese, B. J. *et al.* (1998) 'Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats', in *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, pp. 416–421. doi: 10.1111/j.1530-0277.1998.tb03668.x.

Martel, M. M., Eisenlohr-Moul, T. and Roberts, B. (2017) 'Interactive effects of ovarian steroid hormones on alcohol use and binge drinking across the menstrual cycle', *Journal of Abnormal Psychology*. doi: 10.1037/abn0000304.

Massey, P. V. *et al.* (2004) 'Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression', *Journal of Neuroscience*, 24(36), pp. 7821–7828. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004.

Massey, P. V and Bashir, Z. I. (2007) 'Long-term depression : multiple forms and implications for brain function', *Trends in Neurosciences*, 30(4), pp. 176–184. doi: 10.1016/j.tins.2007.02.005.

Maurage, P. *et al.* (2009) 'Latent deleterious effects of binge drinking over a short period of time revealed only by electrophysiological measures', *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 34(2), pp. 111–118. doi: 10.1016/s1053-8119(09)70040-0.

Maurage, P. *et al.* (2012) 'Cerebral effects of binge drinking: Respective influences of global alcohol

intake and consumption pattern', *Clinical Neurophysiology*. International Federation of Clinical Neurophysiology, 123(5), pp. 892–901. doi: 10.1016/j.clinph.2011.09.018.

Di Mauro, M. *et al.* (2015) 'Neo-synthesis of estrogenic or androgenic neurosteroids determine whether long-term potentiation or depression is induced in hippocampus of male rat', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(OCT), pp. 1–13. doi: 10.3389/fncel.2015.00376.

Maynard, M. E. *et al.* (2018) 'Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder', *Brain Structure and Function*. Springer Berlin Heidelberg, 223(1), pp. 195–210. doi: 10.1007/s00429-017-1482-3.

McEwen, B. S., Nasca, C. and Gray, J. D. (2016) 'Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, pp. 3–23. doi: 10.1038/npp.2015.171.

McGovern, P. E. *et al.* (2004) 'Fermented beverages of pre- and proto-historic China', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), pp. 17593–17598. doi: 10.1073/pnas.0407921102.

McQueeny, T. *et al.* (2009) 'Altered white matter integrity in adolescent binge drinkers', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(7), pp. 1278–1285. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00953.x.

Meda, S. A. *et al.* (2017) 'Heavy drinking in college students is associated with accelerated gray matter volumetric decline over a 2 year period', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11(September), pp. 1–11. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00176.

Medina, K. L. *et al.* (2008) 'Prefrontal cortex volumes in adolescents with alcohol use disorders: Unique gender effects', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(3), pp. 386–394. doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00602.x.

Menuet, A. *et al.* (2002) 'Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions', *Biology of Reproduction*, 66(6), pp. 1881–1892. doi: 10.1095/biolreprod66.6.1881.

Merrill, J. E. and Carey, K. B. (2016) 'Drinking over the lifespan: Focus on college ages', *Alcohol Research: Current Reviews*, pp. 103–114.

Michel, R. H., McGovern, P. E. and Badler, V. R. (1992) 'Chemical evidence for ancient beer [12]', *Nature*, p. 24. doi: 10.1038/360024b0.

Miller, J. W. *et al.* (2007) 'Binge drinking and associated health risk behaviors among high school students', *Pediatrics*, 119(1), pp. 76–85. doi: 10.1542/peds.2006-1517.

Milner, B., Squire, L. R. and Kandel, E. R. (1998) 'and the Study of Memory', *Cell*, 20(3), pp. 445–468. Available at: http://whoville.ucsd.edu/pdfs/285_milner_etal_neuron1998.pdf.

Milner, T. A. *et al.* (2001) 'Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites', *The Journal of Comparative Neurology*, 429(3), pp. 355–371. doi: 10.1002/1096-9861(20010115)429:3<355::AID-CNE1>3.3.CO;2-R.

Milner, T. A. *et al.* (2005) 'Ultrastructural localization of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat hippocampal formation', *Journal of Comparative Neurology*, 491(2), pp. 81–95. doi: 10.1002/cne.20724.

Mitra, S. W. *et al.* (2003) 'Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor α', *Endocrinology*, 144(5), pp. 2055–2067. doi: 10.1210/en.2002-221069.

Mitterling, K. L. *et al.* (2010) 'Cellular and subcellular localization of estrogen and progestin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus', *Journal of Comparative Neurology*, 518(14), pp.

2729–2743. doi: 10.1002/cne.22361.

Monyer, H. *et al.* (1994) 'Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors', *Neuron*, 12(3), pp. 529–540. doi: 10.1016/0896-6273(94)90210-0.

Mordecai, K. L. *et al.* (2017) 'Cortisol reactivity and emotional memory after psychosocial stress in oral contraceptive users', *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), pp. 126–135. doi: 10.1002/jnr.23904.

Mordecai, K. L., Rubin, L. H. and Maki, P. M. (2008) 'Effects of menstrual cycle phase and oral contraceptive use on verbal memory', *Hormones and Behavior*, 54(2), pp. 286–293. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.03.006.

Morishita, W. *et al.* (2007) 'Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression', *Neuropharmacology*, 52(1), pp. 71–76. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.07.005.

Morissette, M. *et al.* (2008) 'Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3–5), pp. 327–338. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.011.

Morris, S. A., Eaves, D. W., *et al.* (2010) 'Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model', *Hippocampus*, 20(5), pp. 596–607. doi: 10.1002/hipo.20665.

Morris, S. A., Kelso, M. L., *et al.* (2010) 'Similar withdrawal severity in adolescents and adults in a rat model of alcohol dependence', *Alcohol*. Elsevier Inc, 44(1), pp. 89–98. doi: 10.1016/j.alcohol.2009.10.017.

Mueller, S. C. *et al.* (2008) 'Early androgen exposure modulates spatial cognition in congenital adrenal hyperplasia (CAH)', *Psychoneuroendocrinology*, 33(7), pp. 973–980. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.04.005.

Mukai, H. *et al.* (2007) 'Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons', *Journal of Neurochemistry*, 100(4), pp. 950–967. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04264.x.

Mulholland, P. J. *et al.* (2018) 'Donepezil Reverses Dendritic Spine Morphology Adaptations and Fmr1 Epigenetic Modifications in Hippocampus of Adult Rats After Adolescent Alcohol Exposure', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 42(4), pp. 706–717. doi: 10.1111/acer.13599.

Mulkey, R. M., Herron, C. E. and Malenka, R. C. (1993) 'An Essential Role for Protein Phsophatases in Hippocampal Long-Term Depression', *Science*, 261(AUGUST), pp. 1051–1055.

Mulkey, R. M. and Malenka, R. C. (1992) 'Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus', *Neuron*, 9(5), pp. 967–975. doi: 10.1016/0896-6273(92)90248-C.

Murakami, G. *et al.* (2015) 'Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus', *Brain Research*. Elsevier, 1621, pp. 133–146. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.002.

Nagel, B. J. *et al.* (2005) 'Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity', *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 139(3), pp. 181–190. doi: 10.1016/j.pscychresns.2005.05.008.

Natale, V. *et al.* (2001) 'Exploration of cyclical changes in memory and mood in postmenopausal

women taking sequential combined oestrogen and progestogen preparations', *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 108(3), pp. 286–290. doi: 10.1016/S0306-5456(00)00070-X.

Naur, P. *et al.* (2007) 'Ionotropic glutamate-like receptor δ2 binds D-serine and glycine', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), pp. 14116–14121. doi: 10.1073/pnas.0703718104.

Neufang, S. *et al.* (2009) 'Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain', *Cerebral Cortex*, 19(2), pp. 464–473. doi: 10.1093/cercor/bhn100.

Newmark, R. E. *et al.* (2013) 'Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory', *Hippocampus*, 23(6), pp. 467–475. doi: 10.1002/hipo.22106.

Nielsen, S. E. *et al.* (2011) 'Hormonal contraception usage is associated with altered memory for an emotional story', *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), pp. 378–384. doi: 10.1016/j.nlm.2011.06.013.

Nixon, K. and Crews, F. T. (2002) 'Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus', *Journal of Neurochemistry*, 83(5), pp. 1087–1093. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01214.x.

Norris, C. M., Korol, D. L. and Foster, T. C. (1996) 'Increased susceptibility to induction of long-term depression and long- term potentiation reversal during aging', *Journal of Neuroscience*, 16(17), pp. 5382–5392. doi: 10.1523/jneurosci.16-17-05382.1996.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J. and J. O'Keefe, J. D. (1971) 'Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat', *Brain Research*, 34(1), pp. 171–175. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124915.

Oberlander, J. G. and Woolley, C. S. (2016) '17β-estradiol acutely potentiates glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus through distinct mechanisms in males and females', *Journal of Neuroscience*, 36(9), pp. 2677–2690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4437-15.2016.

Obernier, J. A. *et al.* (2002) 'Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(3), pp. 521–532. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00715-3.

Obernier, J. A., Bouldin, T. W. and Crews, F. T. (2002) 'Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(4), pp. 547–557. doi: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02573.x.

Okabe, S. *et al.* (1998) 'Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor', *Journal of Neuroscience*, 18(11), pp. 4177–4188. doi: 10.1523/jneurosci.18-11-04177.1998.

Ordoñez, C. *et al.* (2006) 'Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease', *Histology and Histopathology*. doi: 10.14670/HH-21.361.

Ordóñez, C. *et al.* (2012) 'Gender differences in apolipoprotein D expression during aging and in Alzheimer disease', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(2), pp. 433.e11-433.e20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.010.

Ormerod, B. K., Lee, T. T. H. and Galea, L. A. M. (2002) 'Estradiol Initially Enhances but Subsequently Suppresses (via Adrenal Steroids) Granule Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of Adult Female Rats', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1002/neu.10181.

Österlund, M. K. *et al.* (2000) 'Estrogen receptor β (ERβ) messenger ribonucleic acid (mRNA)

expression within the human forebrain: Distinct distribution pattern to ERα mRNA', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(10), pp. 3840–3846. doi: 10.1210/jcem.85.10.6913.

Paccola, C. C. *et al.* (2013) 'The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis', *Anim. Reprod*, 10(4), pp. 677–683.

Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N. and Hollmann, M. (2012) 'GluN3 subunit-containing NMDA receptors: Not just one-trick ponies', *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 35(4), pp. 240–249. doi: 10.1016/j.tins.2011.11.010.

Packard, M. G. (1998) 'Posttraining estrogen and memory modulation', *Hormones and Behavior*, 34(2), pp. 126–139. doi: 10.1006/hbeh.1998.1464.

Packard, M. G. and Teather, L. A. (1997a) 'Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats', *NeuroReport*, 8(14), pp. 3009–3013. doi: 10.1097/00001756-199709290-00004.

Packard, M. G. and Teather, L. A. (1997b) 'Posttraining estradiol injections enhance memory in ovariectomized rats: Cholinergic blockade and synergism', *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(2), pp. 172–188. doi: 10.1006/nlme.1997.3785.

Palmer, C. L. *et al.* (2005) 'Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD', *Neuron*, 47(4), pp. 487–494. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.014.

Di Paola, M. *et al.* (2007) 'Episodic memory impairment in patients with Alzheimer's disease is correlated with entorhinal cortex atrophy: A voxel-based morphometry study', *Journal of Neurology*, 254(6), pp. 774–781. doi: 10.1007/s00415-006-0435-1.

Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. (2013) 'NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 383–400. doi: 10.1038/nrn3504.

Parada, M. *et al.* (2011) 'Binge drinking and declarative memory in university students', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(8), pp. 1475–1484. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01484.x.

Pastino, G. M. *et al.* (1997) 'A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats, and humans', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(1), pp. 147–157. doi: 10.1006/taap.1997.8161.

Patterson, M. A., Szatmari, E. M. and Yasuda, R. (2010) 'AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), pp. 15951–15956. doi: 10.1073/pnas.0913875107.

Pavlov, I. P. (1929) 'Conditioned Reflexes. An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex', *The Journal of Nervous and Mental Disease*.

Pereda, D. *et al.* (2019) 'Changes in presynaptic calcium signalling accompany age-related deficits in hippocampal LTP and cognitive impairment', *Aging Cell*, 18(5), pp. 1–11. doi: 10.1111/acel.13008.

Person, B. and Oinonen, K. A. (2019) 'Emotional Memory in Oral Contraceptive Users: Negative Stimuli Are More Forgettable', *Psychological Reports*. doi: 10.1177/0033294119856554.

Petersen, N., Patihis, L. and Nielsen, S. E. (2015) 'Decreased susceptibility to false memories from misinformation in hormonal contraception users', *Memory*, 23(7), pp. 1029–1038. doi: 10.1080/09658211.2014.949777.

Petit, G. *et al.* (2013) 'Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: A preliminary assessment of event-related potentials', *Psychiatry Research*. Elsevier, 209(3), pp. 494–503. doi:

10.1016/j.psychres.2013.04.005.

Petit, G. *et al.* (2014) 'Binge drinking in adolescents: A review of neurophysiological and neuroimaging research', *Alcohol and Alcoholism*, 49(2), pp. 198–206. doi: 10.1093/alcalc/agt172.

Pettersson, K. and Gustafsson, J.-Å. (2001) 'Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen Action', *Annual Review of Physiology*, 63(1), pp. 165–192. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.165.

Pfefferbaum, A. *et al.* (2016) 'Adolescent Development of Cortical and White Matter Structure in the NCANDA Sample: Role of Sex, Ethnicity, Puberty, and Alcohol Drinking', *Cerebral Cortex*, 26(10), pp. 4101–4121. doi: 10.1093/cercor/bhv205.

Phan, A. *et al.* (2011) 'Rapid effects of estrogen receptor α and β selective agonists on learning and dendritic spines in female mice', *Endocrinology*, 152(4), pp. 1492–1502. doi: 10.1210/en.2010-1273.

Phan, A. *et al.* (2012) 'Low doses of 17β-estradiol rapidly improve learning and increase hippocampal dendritic spines', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 37(10), pp. 2299–2309. doi: 10.1038/npp.2012.82.

Phan, A. *et al.* (2015) 'Rapid increases in immature synapses parallel estrogen-induced hippocampal learning enhancements', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), pp. 16018–16023. doi: 10.1073/pnas.1522150112.

Phillips, S. M. and Sherwin, B. B. (1992) 'Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women', *Psychoneuroendocrinology*, 17(5), pp. 485–495. doi: 10.1016/0306-4530(92)90007-T.

Piekarski, D. J., Boivin, J. R. and Wilbrecht, L. (2017) 'Ovarian Hormones Organize the Maturation of Inhibitory Neurotransmission in the Frontal Cortex at Puberty Onset in Female Mice', *Current Biology*. Elsevier Ltd., 27(12), pp. 1735-1745.e3. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.027.

Pietranera, L. *et al.* (2011) 'Increased aromatase expression in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats: Effects of estradiol administration', *Neuroscience*. Elsevier Inc., 174, pp. 151–159. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.044.

Pihlajamaki, M., Jauhiainen, A. and Soininen, H. (2009) 'Structural and Functional MRI in Mild Cognitive Impairment', *Current Alzheimer Research*, 6(2), pp. 179–185. doi: 10.2174/156720509787602898.

Prange-Kiel, J. *et al.* (2006) 'Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis Causes Region-Specific Downregulation of Synaptic Protein Expression in Hippocampal Neurons', *Hippocampus*, 1031, pp. 1026–1031. doi: doi:10.1002/hipo.20173.

Pyapali, G. K. *et al.* (1999) 'Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation', *Alcohol*, 19(2), pp. 107–111. doi: 10.1016/S0741-8329(99)00021-X.

Quirarte, G. L. *et al.* (2007) 'Estradiol valerate and alcohol intake: Dose-response assessments', *BMC Pharmacology*, 7, pp. 1–14. doi: 10.1186/1471-2210-7-3.

Rassart, E. *et al.* (2000) 'Apolipoprotein D', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), pp. 185–198. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00162-X.

Reid, L. D. *et al.* (2002) 'One injection of estradiol valerate induces dramatic changes in rats' intake of alcoholic beverages', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(3), pp. 601–616. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00732-3.

Rentz, D. M. *et al.* (2017) 'Sex differences in episodic memory in early midlife: Impact of reproductive aging', *Menopause*, 24(4), pp. 400–408. doi: 10.1097/GME.0000000000000771.

Reza Zamani, M., Desmond, N. L. and Levy, W. B. (2000) 'Estradiol modulates long-term synaptic depression in female rat hippocampus', *Journal of Neurophysiology*, 84(4), pp. 1800–1808. doi: 10.1152/jn.2000.84.4.1800.

Richard, J. *et al.* (2019) 'LA CONSOMMATION D'ALCOOL CHEZ LES ADULTES EN FRANCE EN 2017 / ALCOHOL CONSUMPTION IN ADULTS IN FRANCE IN 2017', *Consommation d'alcool, comportements et conséquences pour la santé*, BEH 5-6, pp. 89–97.

Riggs, B. L. and Hartmann, L. C. (2003) 'Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action', *The New England journal of medicine*, 348(12), pp. 618–630.

Risher, M. L. *et al.* (2015) 'Adolescent Intermittent Alcohol Exposure: Persistence of Structural and Functional Hippocampal Abnormalities into Adulthood', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(6), pp. 989–997. doi: 10.1111/acer.12725.

Rivest, R. W. (1991) 'Sexual maturation in female rats: Hereditary, developmental and environmental aspects', *Experientia*, pp. 1026–1038. doi: 10.1007/BF01923338.

Rolland, B. *et al.* (2017) 'Comparison between the WHO and NIAAA criteria for binge drinking on drinking features and alcohol-related aftermaths: Results from a cross-sectional study among eight emergency wards in France', *Drug and Alcohol Dependence*. Elsevier Ireland Ltd, 175, pp. 92–98. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.01.034.

Romeo, R. D. *et al.* (2005) 'Sex differences in hippocampal estradiol-induced N-methyl-D-aspartic acid binding and ultrastructural localization of estrogen receptor-alpha', *Neuroendocrinology*, 81(6), pp. 391–399. doi: 10.1159/000089557.

Ruiz-Palmero, I. *et al.* (2016) 'Oestradiol synthesized by female neurons generates sex differences in neuritogenesis', *Scientific Reports*, 6, pp. 1–18. doi: 10.1038/srep31891.

Russo, S. J. and Nestler, E. J. (2013) 'The brain reward circuitry in mood disorders', *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), pp. 609–625. doi: 10.1038/nrn3381.

Sandberg, D. and Stewart, J. (1982) 'Effects of estradiol benzoate and MER-25 on ethanol consumption in the ovariectomized rat', *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96(4), pp. 635–648. doi: 10.1037/h0077913.

Sanderson, J. L. and Dell'Acqua, M. L. (2011) 'AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity', *Neuroscientist*, pp. 321–336. doi: 10.1177/1073858410384740.

Sanderson, J. L., Gorski, J. A. and Dell'Acqua, M. L. (2016) 'NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca2+-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin', *Neuron*. Elsevier Inc., 89(5), pp. 1000–1015. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.043.

Sanhueza, C., García-Moreno, L. M. and Expósito, J. (2011) 'Weekend alcoholism in youth and neurocognitive aging.', *Psicothema*, 23(2), pp. 209–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504671.

Sarkola, T. *et al.* (1999) 'Acute Effect of Alcohol on Estradiol , Estrone , Hormone in Premenopausal Women', *Alcoholism: Clinical and Exterimental Research*, 23(6), pp. 976–982.

Sasano, H. *et al.* (1998) 'Aromatase in the human central nervous system', *Clinical Endocrinology*, 48(3), pp. 325–329. doi: 10.1046/j.1365-2265.1998.00390.x.

Satta, R., Hilderbrand, E. R. and Lasek, A. W. (2018) 'Ovarian Hormones Contribute to High Levels of Binge-Like Drinking by Female Mice', *Alcohol Clin Exp Res*, 42(2), pp. 286–294. doi: 10.1111/acer.13571.Ovarian.

Scaife, J. C. and Duka, T. (2009) 'Behavioural measures of frontal lobe function in a population of

young social drinkers with binge drinking pattern', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier B.V., 93(3), pp. 354–362. doi: 10.1016/j.pbb.2009.05.015.

Schneider, M. (2013) 'Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior', *Cell and Tissue Research*, 354(1), pp. 99–106. doi: 10.1007/s00441-013-1581-2.

Schrader, T. *et al.* (1972) 'Progesterone-binding of Chick Oviduct', *Components*, 247(1), pp. 51–59.

Schuckit, M. A. *et al.* (2015) 'Latent Trajectory Classes for Alcohol-Related Blackouts from Age 15 to 19 in ALSPAC', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(1), pp. 108–116. doi: 10.1111/acer.12601.

Schulteis, G. *et al.* (2008) 'Intermittent binge alcohol exposure during the periadolescent period induces spatial working memory deficits in young adult rats', *Alcohol*, 42(6), pp. 459–467. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.05.002.

Schweinsburg, A. D. *et al.* (2010) 'A preliminary study of functional magnetic resonance imaging response during verbal encoding among adolescent binge drinkers', *Alcohol*. Elsevier Inc, 44(1), pp. 111–117. doi: 10.1016/j.alcohol.2009.09.032.

Scott, C. J. *et al.* (1998) 'The distribution of estrogen receptors in the brainstem of female sheep', *Neuroscience Letters*, 241(1), pp. 29–32. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00963-4.

Seidenman, K. J. *et al.* (2003) 'Glutamate receptor subunit 2 serine 880 phosphorylation modulates synaptic transmission and mediates plasticity in CA1 pyramidal cells', *Journal of Neuroscience*, 23(27), pp. 9220–9228. doi: 10.1523/jneurosci.23-27-09220.2003.

Sellers, K. J. *et al.* (2015) 'Rapid modulation of synaptogenesis and spinogenesis by 17β-estradiol in primary cortical neurons', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(APR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fncel.2015.00137.

Serfaty, D., Gabriel, R. and Leclercq, I. (2009) 'Contraception par estroprogestatifs', *EMC - Gynécologie*. Elsevier, 4(2), pp. 1–12. doi: 10.1016/s0246-1064(09)44631-0.

Sharifi, F., Reisi, P. and Malek, M. (2019) 'Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons and learning behavior in acute kidney injury, and estradiol replacement in ovariectomized rats', *BMC Neuroscience*. BioMed Central, 20(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12868-019-0534-4.

Sheldahl, L. C. *et al.* (2008) 'Estrogen induces rapid translocation of estrogen receptor β, but not estrogen receptor α, to the neuronal plasma membrane', *Neuroscience*, 153(3), pp. 751–761. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.035.

Shepherd, J. D. and Huganir, R. L. (2007) 'The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 613–643. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516.

Shi, L., Lin, Q. and Su, B. (2015) 'Estrogen regulation of microcephaly genes and evolution of brain sexual dimorphism in primates Speciation and evolutionary genetics', *BMC Evolutionary Biology*. BMC Evolutionary Biology, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12862-015-0398-x.

Shimada, S., Cutting, G. and Uhl, G. R. (1992) 'γ-Aminobutyric acid A or C receptor? γ-Aminobutyric acid ρ1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ-aminobutyric acid responses in Xenopus oocytes', *Molecular Pharmacology*.

Shipton, O. A. and Paulsen, O. (2014) 'GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633). doi: 10.1098/rstb.2013.0163.

Shiroma, S., Yamaguchi, T. and Kometani, K. (2005) 'Effects of 17β-estradiol on chemically induced

long-term depression', *Neuropharmacology*, 49(1), pp. 97–102. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.02.002.

Shors, T. J. (2001) 'Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat', *Neurobiology of Learning and Memory*, 75(1), pp. 10–29. doi: 10.1006/nlme.1999.3956.

Shors, T. J., Chua, C. and Falduto, J. (2001) 'Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus', *Journal of Neuroscience*, 21(16), pp. 6292–6297. doi: 10.1523/jneurosci.21-16-06292.2001.

Shughrue, P. *et al.* (1997) 'The distribution of estrogen receptor-β mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-α knockout mouse', *Endocrinology*, 138(12), pp. 5649–5652. doi: 10.1210/endo.138.12.5712.

Shughrue, P. J., Komm, B. and Merchenthaler, I. (1996) 'The distribution of estrogen receptor-β mRNA in the rat hypothalamus', *Steroids*, 61(12), pp. 678–681. doi: 10.1016/S0039-128X(96)00222-X.

Silverman, I. and Choi, J. (2006) 'Non-Euclidean Navigational Strategies of Women: Compensatory Response or Evolved Dimorphism?', *Evolutionary Psychology*, 4(1), p. 147470490600400. doi: 10.1177/147470490600400105.

Silvestre De Ferron, B. S. *et al.* (2016) 'Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: Key role for GLUN2B subunit', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(1), pp. 1–11. doi: 10.1093/ijnp/pyv087.

Simonian, S. X. and Herbison, A. E. (1997) 'Differential expression of estrogen receptor and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons', *Neuroscience*, 76(2), pp. 517–529. doi: 10.1016/S0306-4522(96)00406-X.

Simpson, E. R. *et al.* (2002) 'Aromatase - A brief overview', *Annual Review of Physiology*, pp. 93–127. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703.

Sircar, R. (2019) 'Estrogen Modulates Ethanol-Induced Memory Deficit in Postpubertal Adolescent Rats', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(1), pp. 61–68. doi: 10.1111/acer.13921.

Sircar, R., Basak, A. K. and Sircar, D. (2009) 'Repeated ethanol exposure affects the acquisition of spatial memory in adolescent female rats', *Behavioural Brain Research*, 202(2), pp. 225–231. doi: 10.1016/j.bbr.2009.03.036.

Sircar, R. and Sircar, D. (2005) 'Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(8), pp. 1402–1410. doi: 10.1097/01.alc.0000175012.77756.d9.

Van Skike, C. E. *et al.* (2012) 'The effect of chronic intermittent ethanol exposure on spatial memory in adolescent rats: The dissociation of metabolic and cognitive tolerances', *Brain Research*. Elsevier B.V., 1453, pp. 34–39. doi: 10.1016/j.brainres.2012.03.006.

Smejkalova, T. and Woolley, C. S. (2010) 'Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism', *Journal of Neuroscience*, 30(48), pp. 16137–16148. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4161-10.2010.

Smith, C. C. *et al.* (2016) '17β estradiol recruits GluN2B-containing NMDARs and ERK during induction of long-term potentiation at temporoammonic-CA1 synapses', *Hippocampus*, 26(1), pp. 110–117. doi: 10.1002/hipo.22495.

Smith, C. C. and McMahon, L. L. (2006) 'Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors', *Journal of Neuroscience*, 26(33), pp. 8517–8522. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5279-05.2006.

Smith, K. W. *et al.* (2017) 'Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern', *Addiction Biology*, 22(2), pp. 490–501. doi: 10.1111/adb.12332.

Sophocleous, A. and Idris, A. I. (2019) 'Ovariectomy/orchiectomy in rodents', in *Methods in Molecular Biology*, pp. 261–267. doi: 10.1007/978-1-4939-8997-3_13.

Spear, L. P. (2000) *The adolescent brain and age-related behavioral manifestations*, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763400000142%0Apapers3://publication/doi/10.1016/S0149-7634(00)00014-2.

Spritzer, M. D. *et al.* (2013) 'Testosterone influences spatial strategy preferences among adult male rats', *Hormones and Behavior*. Elsevier Inc., 63(5), pp. 800–812. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.03.018.

Squeglia, L. M. *et al.* (2012) 'Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry', *Psychopharmacology*, 220(3), pp. 529–539. doi: 10.1007/s00213-011-2500-4.

Squeglia, L. M. *et al.* (2014) 'Brain volume reductions in adolescent heavy drinkers', *Developmental Cognitive Neuroscience*. Elsevier Ltd, 9, pp. 117–125. doi: 10.1016/j.dcn.2014.02.005.

Squeglia, L. M. *et al.* (2015) 'Brain development in heavy-drinking adolescents', *American Journal of Psychiatry*, 172(6), pp. 531–542. doi: 10.1176/appi.ajp.2015.14101249.

Squire, L. R. (2004) 'Memory systems of the brain: A brief history and current perspective', *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), pp. 171–177. doi: 10.1016/j.nlm.2004.06.005.

Squire, L. R. (2009) 'The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience', *Neuron*. Elsevier Inc., 61(1), pp. 6–9. doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.023.

Srivastava, D. P. *et al.* (2008) 'Rapid enhancement of two-step wiring plasticity', 105(38).

Srivastava, D. P. *et al.* (2010) 'Estrogen receptor β activity modulates synaptic signaling and structure', *Journal of Neuroscience*, 30(40), pp. 13454–13460. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3264-10.2010.

Srivastava, D. P. (2012) 'Two-Step Wiring Plasticity - A mechanism for estrogen-induced rewiring of cortical circuits', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, pp. 17–23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.01.006.

Srivastava, D. P. and Penzes, P. (2011) 'Rapid estradiol modulation of neuronal connectivity and its implications for disease', *Frontiers in Endocrinology*, 2(NOV), pp. 1–17. doi: 10.3389/fendo.2011.00077.

Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M. and Penzes, P. (2013) 'Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens', *Pharmacological Reviews*, pp. 1318–1350. doi: 10.1124/pr.111.005272.

Staley, K. and Scharfman, H. (2005) 'A woman's prerogative', *Nature Neuroscience*, pp. 697–699. doi: 10.1038/nn0605-697.

Stanton, P. K. (1996) 'LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity', *Hippocampus*, 6(1), pp. 35–42. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:1<35::AID-HIPO7>3.0.CO;2-6.

Stanton, P. K. *et al.* (2003) 'Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide', *Journal of Neuroscience*, 23(13), pp. 5936–5944. doi: 10.1523/jneurosci.23-13-05936.2003.

Steinberg, J. P. *et al.* (2006) 'Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its

interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression', *Neuron*, 49(6), pp. 845–860. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.025.

Stelly, C. E. *et al.* (2012) 'Long-Term Oestradiol Treatment Enhances Hippocampal Synaptic Plasticity that is Dependent on Muscarinic Acetylcholine Receptors in Ovariectomised Female Rats', *Journal of Neuroendocrinology*, 24(6), pp. 887–896. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02287.x.

Stent, G. S. (1973) 'A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(4), pp. 997–1001. doi: 10.1073/pnas.70.4.997.

Stephens, C., Pachana, N. A. and Bristow, V. (2006) 'The effect of hormone replacement therapy on mood and everyday memory in younger mid-life women', *Psychology, Health and Medicine*, 11(4), pp. 461–469. doi: 10.1080/13548500600678180.

Strauss, J. and Barbieri, R. (2013) *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Edited by E. H. Sciences.

Strong, M. N. *et al.* (2010) '"Binge" drinking experience in adolescent mice shows sex differences and elevated ethanol intake in adulthood', *Hormones and Behavior*, 58(1), pp. 82–90. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.10.008.

Sugarman, D. E., Demartini, K. S. and Carey, K. B. (2009) 'Are women at greater risk? An examination of alcohol-related consequences and gender', *American Journal on Addictions*, 18(3), pp. 194–197. doi: 10.1080/10550490902786991.

Suryavanshi, P. S. *et al.* (2016) 'Glutamate delta-1 receptor regulates metabotropic glutamate receptor 5 signaling in the hippocampus', *Molecular Pharmacology*, 90(2), pp. 96–105. doi: 10.1124/mol.116.104786.

Suthana, N. *et al.* (2012) 'Memory enhancement and deep-brain stimulation of the entorhinal area', *New England Journal of Medicine*, 366(20), p. 1945. doi: 10.1056/NEJMc1203204.

Sutker, P. B. *et al.* (1983) 'Alcohol Use, Negative Mood States, and Menstrual Cycle Phases', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 7(3), pp. 327–331. doi: 10.1111/j.1530-0277.1983.tb05472.x.

Swartzwelder, H. S. *et al.* (2016) 'Changes in the Adult GluN2B Associated Proteome following Adolescent Intermittent Ethanol Exposure', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0155951.

Swartzwelder, H. S., Wilson, W. A. and Tayyeb, M. I. (1995) 'Age-Dependent Inhibition of Long-Term Potentiation by Ethanol in Immature Versus Mature Hippocampus', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19(6), pp. 1480–1485. doi: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb01011.x.

Szőnyi, A. *et al.* (2019) 'Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation', *Science (New York, N.Y.)*, 364(6442), pp. 0–14. doi: 10.1126/science.aaw0445.

Takamiya, K. *et al.* (2008) 'The glutamate receptor-interacting protein family of GluR2-binding proteins is required for long-term synaptic depression expression in cerebellar Purkinje cells', *Journal of Neuroscience*, 28(22), pp. 5752–5755. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0654-08.2008.

Tan, S. E., Wenthold, R. J. and Soderling, T. R. (1994) 'Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin- dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons', *Journal of Neuroscience*, 14(3 I), pp. 1123–1129. doi: 10.1523/jneurosci.14-03-01123.1994.

Tanapat, P. *et al.* (1999) 'Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat', *Journal of Neuroscience*, 19(14), pp. 5792–5801. doi:

10.1523/jneurosci.19-14-05792.1999.

Tang, Y. P. *et al.* (1999) 'Genetic enhancement of learning and memory in mice', *Nature*, 401(6748), pp. 63–69. doi: 10.1038/43432.

Tapert, S. F. *et al.* (2002) 'Substance use and withdrawal: Neuropsychological functioning over 8 years in youth', *Journal of the International Neuropsychological Society*, 8(7), pp. 873–883. doi: 10.1017/S1355617702870011.

Tapia-Rojas, C. *et al.* (2018) 'Adolescent Binge Alcohol Exposure Affects the Brain Function Through Mitochondrial Impairment', *Molecular Neurobiology*. Molecular Neurobiology, 55(5), pp. 4473–4491. doi: 10.1007/s12035-017-0613-4.

Tatemoto, K. (2004) 'Neuropeptide Y: History and Overview', in. doi: 10.1007/978-3-642-18764-3_1.

Taylor, J. L. *et al.* (1996) 'Alcohol elimination and simulator performance of male and female aviators: A preliminary report', *Aviation Space and Environmental Medicine*.

Teoh, S. K. *et al.* (1988) 'Alcohol effects on naltrexone-induced stimulation of pituitary, adrenal, and gonadal hormones during the early follicular phase of the menstrual cycle', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66(6), pp. 1181–1186. doi: 10.1210/jcem-66-6-1181.

Thiels, E., Barrionuevo, G. and Berger, T. W. (1994) 'Excitatory stimulation during postsynaptic inhibition induces long-term depression in hippocampus in vivo', *Journal of Neurophysiology*, 72(6), pp. 3009–3016. doi: 10.1152/jn.1994.72.6.3009.

Thomasson, H. (2000) 'Alcohol elimination: faster in women?', *Alcohol Clin Exp Res*, 24(4), pp. 419–420. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10798573.

Titolo, D. *et al.* (2008) 'Estrogen facilitates both phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK1/2 mitogen-activated protein kinase membrane signaling required for long-term neuropeptide Y transcriptional regulation in clonal, immortalized neurons', *Journal of Neuroscience*, 28(25), pp. 6473–6482. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0514-08.2008.

Tivis, L. J. *et al.* (2008) 'Alcohol and estrogen replacement therapy in postmenopausal women: Direct and mediated effects on cognitive component processes', *Neuropsychobiology*, 58(2), pp. 104–110. doi: 10.1159/000162357.

Toda, A. M. A. and Huganir, R. L. (2015) 'Regulation of AMPA receptor phosphorylation by the neuropeptide PACAP38', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(21), pp. 6712–6717. doi: 10.1073/pnas.1507229112.

Tokuda, K., Zorumski, C. F. and Izumi, Y. (2007) 'Modulation of hippocampal long-term potentiation by slow increases in ethanol concentration', *Neuroscience*, 146(1), pp. 340–349. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.01.037.

Torres, O. V *et al.* (2014) 'Female Rats Display Enhanced Rewarding Effects of Ethanol That Are Hormone Dependent', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(1), pp. 108–115. doi: 10.1111/acer.12213.

Townshend, J. M. and Duka, T. (2005) 'Binge drinking, cognitive performance and mood in a population of young social drinkers', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(3), pp. 317–325. doi: 10.1097/01.ALC.0000156453.05028.F5.

Tozzi, A. *et al.* (2019) 'Bidirectional Synaptic Plasticity Is Driven by Sex Neurosteroids Targeting Estrogen and Androgen Receptors in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons', *Frontiers in Cellular*

Neuroscience, 13(December), pp. 1–13. doi: 10.3389/fncel.2019.00534.

Trouche, S. *et al.* (2019) 'A Hippocampus-Accumbens Tripartite Neuronal Motif Guides Appetitive Memory in Space', *Cell*, 176(6), pp. 1393-1406.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.037.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T. and Tonegawa, S. (1996) 'The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory', *Cell*. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81827-9.

Tsurugizawa, T. *et al.* (2005) 'Estrogen induces rapid decrease in dendritic thorns of CA3 pyramidal neurons in adult male rat hippocampus', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(4), pp. 1345–1352. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.188.

Tuscher, J. J. *et al.* (2016) 'Inhibition of local estrogen synthesis in the hippocampus impairs hippocampal memory consolidation in ovariectomized female mice', *Hormones and Behavior*. Elsevier B.V., 83, pp. 60–67. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.05.001.

Valbuena, S. and Lerma, J. (2020) 'Kainate Receptors, Homeostatic Gatekeepers of Synaptic Plasticity', *Neuroscience*. IBRO, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.11.050.

Vandegrift, B. J. *et al.* (2017) 'Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol', *PLoS ONE*, 12(11), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0187698.

Varea, O. *et al.* (2009) 'Estradiol activates β-catenin dependent transcription in neurons', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005153.

Vedder, L. C. *et al.* (2013) 'Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors', *Hippocampus*, 23(1), pp. 108–115. doi: 10.1002/hipo.22068.

Vetreno, R. P. and Crews, F. T. (2015) 'Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning', *Frontiers in Neuroscience*, 9(FEB), pp. 1–12. doi: 10.3389/fnins.2015.00035.

Vetter-O'Hagen, C. S. and Spear, L. P. (2011) 'The effects of gonadectomy on age- and sex-typical patterns of ethanol consumption in Sprague-Dawley rats', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(11), pp. 2039–2049. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01555.x.

Vierk, R. *et al.* (2012) 'Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice', *Journal of Neuroscience*, 32(24), pp. 8116–8126. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012.

Vinader-Caerols, C. *et al.* (2017) 'Differential effects of alcohol on memory performance in adolescent men and women with a binge drinking history', *Alcohol and Alcoholism*, 52(5), pp. 610–616. doi: 10.1093/alcalc/agx040.

Visser, M. and Coelingh Bennink, H. J. T. (2009) 'Clinical applications for estetrol', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1–2), pp. 85–89. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.12.013.

Vossler, M. R. *et al.* (1997) 'cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway', *Cell*, 89(1), pp. 73–82. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80184-1.

Vouimba, R. M. *et al.* (2000) '17β-estradiol suppresses expression of long-term depression in aged rats', *Brain Research Bulletin*, 53(6), pp. 783–787. doi: 10.1016/S0361-9230(00)00377-4.

Voyer, D., Voyer, S. and Bryden, M. P. (1995) 'Magnitude of sex differences in spatial abilities: A meta-analysis and consideration of critical variables', *Psychological Bulletin*, 117(2), pp. 250–270. doi: 10.1037/0033-2909.117.2.250.

Wade, C. B. *et al.* (2001) 'Estrogen receptor (ER)α and ERβ exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway', *Endocrinology*, 142(6), pp. 2336–2342. doi: 10.1210/endo.142.6.8071.

Wagatsuma, A. *et al.* (2017) 'Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(2), pp. E310–E316. doi: 10.1073/pnas.1714082115.

Walf, A. A., Rhodes, M. E. and Frye, C. A. (2006) 'Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats', *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(1), pp. 35–46. doi: 10.1016/j.nlm.2006.01.004.

Wang, D. *et al.* (2009) 'Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats', *PLoS ONE*, 4(10), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0007486.

Warren, S. G. *et al.* (1995) 'LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats', *Brain Research*, 703(1–2), pp. 26–30. doi: 10.1016/0006-8993(95)01059-9.

Warren, S. G. and Juraska, J. M. (1997) 'Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle.', *Behavioral Neuroscience*, 111(2), pp. 259–266. doi: 10.1037//0735-7044.111.2.259.

Waters, E. M. *et al.* (2015) 'G-protein-coupled estrogen receptor 1 is anatomically positioned to modulate synaptic plasticity in the mouse hippocampus', *Journal of Neuroscience*, 35(6), pp. 2384–2397. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1298-14.2015.

Watson, C. S. *et al.* (2010) 'Estrogens of multiple classes and their role in mental health disease mechanisms', *International Journal of Women's Health*, pp. 153–166. doi: 10.2147/ijwh.s6907.

Weiner, J. L. and Valenzuela, C. F. (2006) 'Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice', *Pharmacology and Therapeutics*, pp. 533–554. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.11.002.

White, A. M. *et al.* (2000) 'Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: Differential impact on subsequent responsiveness to ethanol', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(8), pp. 1251–1256. doi: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb02091.x.

White, A. M. *et al.* (2002) 'Differential effects of ethanol on motor coordination in adolescent and adult rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(3), pp. 673–677. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00860-2.

White, A. M. and Swartzwelder, H. S. (2004) 'Hippocampal function during adolescence: A unique target of ethanol effects', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021, pp. 206–220. doi: 10.1196/annals.1308.026.

Wide, J. K. *et al.* (2004) 'High level estradiol impairs and low level estradiol facilitates non-spatial working memory', *Behavioural Brain Research*, 155(1), pp. 45–53. doi: 10.1016/j.bbr.2004.04.001.

Williams, C. L., Barnett, A. M. and Meck, W. H. (1990) 'Organizational Effects of Early Gonadal Secretions on Sexual Differentiation in Spatial Memory', *Behavioral Neuroscience*, 104(1), pp. 84–97. doi: 10.1037/0735-7044.104.1.84.

Wills, T. A. *et al.* (2015) 'Chronic intermittent alcohol disrupts the GluN2B- associated proteome and specifically regulates group I mGlu receptor-dependent long-term depression', *Addiction Biology*, pp. 275–290. doi: 10.1111/adb.12319.

Wong, J. M. and Gray, J. A. (2018) 'Long-term depression is independent of GluN2 subunit composition', *Journal of Neuroscience*, 38(19), pp. 4462–4470. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0394-

18.2018.

Wood, G. E. and Shors, T. J. (1998) 'Stress facilitates classical conditioning in males , but impairs classical conditioning in females through activational', *Psychology*, 95(March), pp. 4066–4071.

Woolley, C. S. (2007) 'Acute effects of estrogen on neuronal physiology', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 657–680. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219.

Woolley, C. S. and McEwen, B. S. (1992) 'Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat', *Journal of Neuroscience*, 12(7), pp. 2549–2554. doi: 10.1523/jneurosci.12-07-02549.1992.

Xia, J. *et al.* (2000) 'Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins', *Neuron*, 28(2), pp. 499–510. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00128-8.

Yague, J. G. *et al.* (2008) 'Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus', *Brain Research*, 1209, pp. 115–127. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.061.

Yener, T. *et al.* (2007) 'Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: How reliable?', *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 36(1), pp. 75–77. doi: 10.1111/j.1439-0264.2006.00743.x.

Yin, X. *et al.* (2011) 'Molecular Motor KIF17 Is Fundamental for Memory and Learning via Differential Support of Synaptic NR2A/2B Levels', *Neuron*. Elsevier Inc., 70(2), pp. 310–325. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.049.

Yokomaku, D. *et al.* (2003) 'Estrogen enhances depolarization-induced glutamate release through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cultured hippocampal neurons', *Molecular Endocrinology*, 17(5), pp. 831–844. doi: 10.1210/me.2002-0314.

Zaidi, Z. F. (2010) 'Gender Differences in Human Brain: A Review', *The Open Anatomy Journal*, 2, pp. 37–55. doi: 10.2174/1877609401002010037.

Zamani, M. R., Levy, W. B. and Desmond, N. L. (2004) 'Estradiol increases delayed, N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitation in the hippocampal CA1 region', *Neuroscience*, 129(1), pp. 243–254. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.082.

Zeisser, C. *et al.* (2013) 'A Systematic Review and Meta-Analysis of Alcohol Consumption and Injury Risk as a Function of Study Design and Recall Period', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(SUPPL.1), pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01919.x.

Zhang, Q. G. *et al.* (2014) 'Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 389(1–2), pp. 84–91. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.019.

Zhang, Z. *et al.* (2010) 'Progesterone promotes the survival of newborn neurons in the dentate gyrus of adult male mice', *Hippocampus*, 20(3), pp. 402–412. doi: 10.1002/hipo.20642.

Zhou, L. *et al.* (2010) 'Aromatase inhibitors induce spine synapse loss in the hippocampus of ovariectomized mice', *Endocrinology*, 151(3), pp. 1153–1160. doi: 10.1210/en.2009-0254.

Zhou, Z. *et al.* (2018) 'The C-terminal tails of endogenous GluA1 and GluA2 differentially contribute to hippocampal synaptic plasticity and learning', *Nature Neuroscience*. Springer US, 21(1), pp. 50–65. doi: 10.1038/s41593-017-0030-z.

Biblio non issues d'articles

INSEE. *Tableaux de l'économie française, édition 2017. Consommation des ménages*. 2017 : 72-115

Cour des comptes. *Les politiques de lutte contre les consommations nocives d'alcool*. 2016 : 262 p.

OFDT. *Synthèse thématique : alcool*. Mai 2018

OFDT. *Drogues : perceptions des produits, des politiques publiques et des usagers*. Avril 2019

MILD&CA. *Santé Publique France présente les nouvelles recommandations sur l'alimentation, y compris l'alcool, l'activité physique et la sédentarité*. Janvier 2019

OMS. *Global status report on alcohol and health.* 2018

Davies 1917, pl. XXIIIB, XXVI, partie basse de la paroi nord-ouest, salle transversale.

Mu-Chou Poo, *Wine and Wine Offering in the Religion of Ancient Egypt*, p25-26, Londres, 1995

Pascal Vernus, *Sagesses de l'Egypte pharaonique*, la mise en garde de l'apprenti scribe contre les médaits de l'alcool, p381-382, Paris, 2001

Résumé

Le *binge drinking* (BD) est un mode de consommation d'alcool très répandu chez les jeunes adultes et qui se caractérise par une prise massive et épisodique d'alcool dans un laps de temps court afin d'atteindre rapidement l'état d'ivresse. Chez ces jeunes, le *BD* est responsable de perturbations des capacités cognitives et la consommation des femmes rattrape celle des hommes alors qu'elles seraient plus sensibles aux effets délétères de l'éthanol (EtOH) sur le cerveau. Dans ce contexte, il nous est apparu important de comprendre les différences liées au sexe dans les effets du *BD* sur le fonctionnement cérébral, et notamment la plasticité neuronale de l'hippocampe, mécanisme cellulaire de la mémoire et des apprentissages. Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été i) d'explorer l'impact du cycle ovarien sur les effets du *BD* sur la plasticité neuronale de l'hippocampe, ii) de mesurer la modulation des effets de l'éthanol par les œstrogènes pendant l'adolescence chez la femelle et chez le mâle, et iii) de chercher les mécanismes d'action impliqués. Ainsi, nous avons enregistré chez la ratte adolescente la plasticité du réseau hippocampique *ex vivo* après une exposition courte à l'éthanol après 2 binges d'éthanol. Nous avons mis en évidence une abolition de la plasticité de type dépression à long terme (LTD) à 24h de délai, seulement lorsque l'administration d'éthanol était effectuée pendant le pic d'œstrogènes endogènes, suggérant une interaction entre éthanol et œstrogènes (E2). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré chez des rattes pubères, prépubères, et chez des mâles adolescents les effets sur la DLT d'un traitement exogène d'E2+EtOH. L'abolition de la DLT a été observé à chaque fois. L'utilisation d'antagonistes spécifiques nous a permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs aux œstrogènes, ainsi que de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA dans ces résultats. Nous concluons que les œstrogènes pourraient être un facteur de vulnérabilité liés au genre vis-à-vis des effets de l'alcool sur les capacités cognitives chez les femelles, pendant l'adolescence.

Mots-clés : alcool, plasticité synaptique, *binge drinking*, hippocampe, adolescence, œstrogène

Abstract

Binge drinking (BD) is a kind of alcohol consumption mostly appreciated by young people and defined by an episodic and huge alcohol intake in a short period of time in order to reach drunkenness. Within young people populations, BD is responsible of cognitive impairments, and the gender gap regarding alcohol consumption is now closed while women may be more sensitive to the deleterious effects of ethanol (EtOH) on the brain. In this context, it appears important to understand the sex-difference effects of binge drinking on brain function, especially the neuronal plasticity of the hippocampus which is the cellular mechanism of memory and learning. Thereby, the main goals of my thesis work were i) to investigate the importance of the estrus cycle on the effect of a short BD exposition on the hippocampal network plasticity, ii) to measure the estrogens-induced modulation of ethanol effects during adolescence period in female and male rats, and iii) to explore action mechanisms that might be involved. Thus, we recorded in adolescent female rats the plasticity of hippocampus slices after a short BD exposition. We have shown a Long-Term Depression (LTD) plasticity abolition 24h after the first ethanol injection, only when ethanol was injected during the endogenous peak of estrogens, suggesting an interaction between those two molecules. Then, we verified the hypothesis of an E2-EtOH interaction in post-pubescent, pre-pubescent female rats as well as in pubescent male rats after a treatment of exogenous E2 and EtOH. LTD abolition was found in every group. We used specific antagonists to highlight the implication of estrogens receptors and NMDA receptor GluN2B subunit in those results. We concluded that estrogens might be a gender driven vulnerability factor regarding alcohol effects on cognitive function during adolescence.

Key words : *alcohol, synaptic plasticity, binge drinking, hippocampus, adolescent, estrogen*