



HAL
open science

**Perturbation par l'éthanol de la plasticité synaptique
reliée aux sous-unités GluN2A et GluN2B dans
l'hippocampe chez le rongeur : implication des HDAC2
et HSF2**

Ichrak Drissi

► **To cite this version:**

Ichrak Drissi. Perturbation par l'éthanol de la plasticité synaptique reliée aux sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'hippocampe chez le rongeur : implication des HDAC2 et HSF2. Sciences agricoles. Université de Picardie Jules Verne, 2018. Français. NNT : 2018AMIE0049 . tel-03647403

HAL Id: tel-03647403

<https://theses.hal.science/tel-03647403>

Submitted on 20 Apr 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 et santé
Spécialité Neurosciences

Présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

De l'Université de Picardie Jules Verne

par

Ichrak DRISSI

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

***Perturbation par l'éthanol de la plasticité synaptique reliée
aux sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'hippocampe chez
le rongeur : implication des HDAC2 et HSF2***

Soutenue le 28/11/2018, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Mme. Florence NOBLE, Directeur de recherche CNRS

Rapporteur

Mr. Jean-Luc GAIARSA, Directeur de recherche INSERM

Rapporteur

Mme. Valérie MEZGER, Directeur de recherche CNRS

Examineur

Mr. Mickael NAASSILA, Professeur des universités

Directeur de thèse

Mr. Olivier PIERREFICHE, Professeur des universités

Directeur de thèse

À mes parents...



Cette thèse a été réalisée au sein du Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP, UMR1247 INSERM), situé au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université de Picardie Jules Verne, chemin du Thil, 80025, Amiens.



L'allocation de recherche dont j'ai bénéficié pendant ces trois ans a été accordée, en partie, par le Conseil Régional de Picardie



L'autre part de mon allocation de recherche ainsi que les travaux de cette thèse ont été financés par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médical (INSERM)

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury :

Le **Dr. Florence Noble**, Directeur de Recherche CNRS à l'université Paris Descartes d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Le **Dr. Jean-Luc Gaiarsa**, Directeur de Recherche à l'institut de Neurobiologie de Marseille, qui a accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse et qui m'a accueilli un jour dans son laboratoire.

Le **Dr. Valérie Mezger**, Directeur de Recherche à l'université Paris Descartes d'accepter d'être examinatrice de mon travail de doctorat. Je la remercie également pour sa sympathie et sa gentillesse.

Le **Pr. Mickael Naassila**, Professeur à l'université de Picardie Jules Verne, de m'avoir accepté au sein de son laboratoire, de m'intégrer dans son équipe, de m'avoir encouragé pendant ces trois ans de thèse et de tous les échanges, scientifiques ou autres, que nous avons eu ensemble.

Le **Pr. Olivier Pierrefiche**, Professeur à l'université de Picardie Jules Verne, de m'avoir encadré, encouragé, soutenu. Je le remercie pour sa confiance, sa disponibilité, sa sympathie et les séances de psychologie qu'il m'a offert. Merci de m'avoir accordé tout ce temps pour que ce travail de thèse aboutisse à ce manuscrit.

Je remercie également tous les membres du laboratoire GRAP : Dr Catherine Vilpoux pour sa sympathie, son sourire, ses cadeaux et son chat (Mr Paillette). Dr Jérôme Jean-Blanc pour ses conseils. Dr Stéphane Peineau pour toute sa rigueur et son exigence. Dr Hakim Houchi pour sa joie de vivre et ses gâteaux. Dr Hicham Bouhleb et Dr Ingrid Marq pour leur sympathie. Elodie Pecourt la meilleure secrétaire de tous les laboratoires. Johann Antol pour sa gentillesse et sa disponibilité et véronique Debuysscher pour son sourire.

Je tiens à remercier les jeunes membres du laboratoire GRAP, les anciens et les nouveaux. Je commence par les anciens avec qui j'ai passé un très bon moment au sein du laboratoire mais aussi à l'extérieur : Alexandre Robert d'être un ami et un collègue pas comme les autres, Romain pour sa générosité et sa gentillesse, Sophie Lebourgeois d'être une voisine de bureau (je penserai toujours à notre séjour à Bordeaux), Carmen Gonzalez Marin pour sa joie de vivre, Fabien Coune pour sa sympathie, Victor Echverry Alzate pour son sourire, sa disponibilité et sa maîtrise des statistiques, Benoit Sylvestre de Ferron avec qui je n'ai pas travaillé mais j'ai passé de bons moments sur Amiens et Bordeaux, et Shadi Rachelle Alary qui a fini par être une amie très proche.

Ma gratitude s'adresse également à Kevin Rabiant avec qui je partage la passion pour les enregistrements du potentiel de champs, je le remercie aussi pour sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci à Chloé Deschamps pour tous les moments de folies que nous avons passé ensemble, pour les soirées dans le laboratoire pour finir les expériences, je lui souhaite un bon courage pour ces trois ans de thèse et je compte sur elle pour faire avancer les projets. Je remercie aussi Pierre Sauton et Cédric Bertrand et je leur souhaite une bonne continuation. Un grand merci à Gregory Fouquet pour sa bonne humeur ainsi que Charles Antoine Papillon, voisin de bureau.

Mes sincères remerciements s'adressent à mes parents qui ont cru en moi et qui ne cessent pas de m'encourager pour encore aller de l'avant. Merci et encore merci pour tout. Je remercie à tout cœur mon frère Salim, mon neveu Rayssan, toutes mes tantes et mes oncles, mes cousins ainsi que tous les membres de ma famille pour leurs encouragements, leur patience et leur présence.

Une petite pensée à mes amies : Mariem, Meriam, Sarra, Line, Sondes et Hajer pour les bons moments passés ensemble.

Résumé

L'alcool (EtOH) est une des substances d'abus les plus consommées en France chez les adolescents comme chez les adultes. La consommation d'EtOH induit des déficits mnésiques en perturbant les phénomènes de plasticité synaptique de type potentialisation à long terme (PLT) et dépression à long terme (DLT) dépendants du récepteur NMDA (PLT_{NMDA} et DLT_{NMDA}), et qui constituent la base cellulaire des apprentissages et de la mémoire, notamment au niveau de l'hippocampe. La composition en sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA peut influencer l'induction de ces deux formes de plasticité synaptique selon le modèle théorique de Bienenstock et al. (1982). De plus, la plasticité synaptique est sous l'influence de mécanismes épigénétiques et/ou de facteurs de transcription. A l'heure actuelle, les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la perturbation de la plasticité synaptique suite à la consommation d'EtOH demeurent mal compris. Durant ma thèse, j'ai testé l'hypothèse que les perturbations de la plasticité synaptique dépendante du NMDA impliqueraient une modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B dans un modèle de *binge drinking-like* de rat jeune adulte et dans un modèle d'alcoolisation chronique chez des souris adultes. Afin de comprendre les mécanismes sous-tendant ces perturbations, j'ai étudié l'implication des facteurs épigénétiques et le rôle d'un facteur de transcription de la famille des heat shock factor, HSF2. Pour cela, j'ai utilisé la technique d'enregistrement de potentiel de champs somatique et dendritique (potentiel postsynaptique excitateur NMDA ; PPSE-NMDA) dans l'aire CA1 de tranches d'hippocampe. De manière intéressante, nos résultats montrent que les deux types d'alcoolisation, aigue et chronique, augmentent la sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B alors que la sensibilité à l'antagoniste de la sous-unité GluN2A diminue. Chez le rat jeune adulte, ces modifications sont accompagnées d'une forte réduction de la DLT_{NMDA} et d'un déficit d'apprentissage (test de reconnaissance de nouvel objet). Dans ce modèle, l'inhibition de l'activité des enzymes HDACs, responsables de la désacétylation de la chromatine, prévient l'ensemble des effets de l'EtOH (sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA, DLT_{NMDA} et apprentissage). Concernant HSF2 et avant toute alcoolisation, des souris adultes *hsf*^{-/-} présentent une absence de DLT_{NMDA} accompagnée d'une plus grande sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste GluN2B comparé à des souris sauvages. L'exposition chronique à l'EtOH induit chez les souris sauvages, une abolition de la DLT_{NMDA} accompagnée d'une augmentation de la sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste GluN2B et à une diminution de la sensibilité de ce signal à un antagoniste GluN2A. En revanche, les souris *hsf*^{-/-} ne présentent aucune de ces modifications.

Ainsi, l'ensemble de mes travaux de thèse montre que quel que soit le type d'alcoolisation, aigue ou chronique, mais aussi l'espèce animale utilisée, rat ou souris, l'EtOH induit des adaptations du réseau hippocampique qui consiste en une augmentation de la sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste GluN2B et en une diminution de sa sensibilité à un antagoniste GluN2A ; modifications qui accompagnent une abolition de la DLT. Cette réponse globale à l'EtOH mettrait en jeu des facteurs épigénétiques modulant l'état d'acétylation de l'ADN et des facteurs transcriptionnels de type heat shock.

Mots clés : Ethanol, plasticité synaptique, GluN2B, GluN2A, hippocampe, épigénétique, HSF

Abstract

Alcohol (EtOH) remains one of the most consumed substances of abuse in France among adolescents and adults. EtOH consumption, inducing learning deficits through disturbances of the NMDA-dependent form of synaptic plasticity (long term potentiation, LTP and long-term depression, LTD), the cellular signal responsible for learning and memory, notably into the hippocampus, involved in memory formation in mammals. Importantly, induction of NMDA-dependent synaptic plasticity relies on the subunit composition of the NMDA receptor (GluN2A and GluN2B) while mechanisms of genome regulation such as epigenetic or some transcription factors may have important role in determining the quality of synaptic plasticity signals. However, the molecular mechanisms by which EtOH disrupts NMDA-dependent synaptic plasticity are still unclear. During my thesis work, I tested the hypothesis that NMDA-dependent synaptic plasticity is disrupted by EtOH through the modulation of the involvement of GluN2B and GluN2A subunits of the receptor whatever the type of EtOH exposure, either acute in young adult (binge-drinking like model) rodents or chronic in adult rodents. I further tested the involvement of epigenetic and the role of HSF2, a transcription factor in the modifications induced by EtOH. Using pharmacological tools and field potential recordings in CA1 area of hippocampal slices from adolescent rats and adult mice, I found that both acute and chronic ethanol exposure increased field NMDA excitatory post synaptic potential (fNMDA-EPSP) sensitivity to a GluN2B antagonist while sensitivity to GluN2A antagonist was decreased. In adolescent rats, these modifications were accompanied with a lower LTD without affecting LTP and with memory impairment. Interestingly, inhibition of enzymes responsible for chromatin deacetylation (HDAC) in binge like adolescent rat model, prevents the EtOH effects in learning performance associated with a correction of the GluN2A/GluN2B balance and LTD. Concerning the role of HSF2, I found that before chronic EtOH consumption, fNMDA-EPSPs of HSF2 KO adult mice lack LTD and showed the opposite sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists compared to WT mice. Chronic EtOH exposure in HSF2 KO mice induced different adaptations than in WT animals. Altogether, my thesis work show that, 1) regardless the type of EtOH exposure, the hippocampus neuronal network adapt via changes in the balance between GluN2A and GluN2B subunits leading to LTD reduction and learning impairment; 2) these EtOH-induced changes in fNMDA-EPSPs involved epigenetic processes and 3) some transcription factors, affecting basal conditions of the role for GluN2A/GluN2B balance determines the capacity to respond to EtOH exposure.

Key words: EtOH, synaptic plasticity, GluN2B, GluN2A, hippocampus, epigenetic, HSF

Liste des travaux et publications

Articles – Revues internationales à comité de lecture

Memory impairment in adolescent rat after binge drinking: HDAC2 modulates GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits in the hippocampus.

Drissi, I; Deschamps, C; Alary, R; Fouquet, G; Peineau, S; Gosset, P; Sueur, H; Marcq, I; Debuysscher, V; Naassila, M; Vilpoux, C; Pierrefiche, O. *Submitted in Addiction biology.*

Heat Shock Transcription Factor 2 (HSF2) modulates hippocampus synaptic transmission, plasticity and neuroadaptations to voluntary ethanol consumption through GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits signaling.

Drissi I, Deschamps C., Alary R., González-Marín M.C., Robert A., Mezger V., Dubreuil V., Naassila M., Pierrefiche O*. *En préparation*

Communications orales

Journée Jeunes Chercheurs, Décembre 2017, Reims

Le facteur de réponse aux chocs thermique2 (HSF2) participe à la réponse des neurones de l'hippocampe à une exposition chronique à l'éthanol.

Drissi I, Robert A, Dubreuil V, Mezguer V, Naassila M, Pierrefiche O.

21th Annual Meeting of the LARC-Neuroscience network, October 2017, Lille

HSF2 is involved in synaptic plasticity and in response to ethanol in the hippocampus: Modulation of GluN2A/GluN2B ratio.

Drissi I, Alari RC, Robert A, Dubreuil V, Mezguer V, Nassila M, Pierrefiche O.

Communications affichées

Société Française des Neurosciences, mai 2017, Bordeaux

Lack of response to chronic ethanol exposure in CA1 area of heat shock factor 2 knockout mice.

Drissi I., Rabiant K, Dubreuil V, Mezguer V, Naassila M, Pierrefiche O

European College of Neuropsychopharmacology, Septembre 2017, Paris

Two binges of ethanol a day induce epigenetic modulations and astrogliosis in adolescent rats.

Vilpoux C, **Drissi I.**, Gosset P, Roger C, Chagas Ricardo J, Robert A, Naassila M, Perrefiche O.

LARC neuroscience, Octobre 2018, Rouen

Heat Shock Transcription Factor 2 (HSF2) modulates plasticity and neuroadaptations to voluntary ethanol consumption through GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits signaling

Drissi I., Deschamps C., Alary R., Dubreuil V., Mezger V., Naassila M., Pierrefiche O.

LARC neuroscience, Octobre 2018, Rouen

Memory impairment in adolescent rat after binge drinking: implications of epigenetic mechanisms and GluN2 subunits

Deschamps C., **Drissi I.**, Alary R., Vilpoux C, Naassila M., Pierrefiche O.

Society for Neuroscience, Novembre 2018 San Diego.CA.USA

Epigenetic mechanism regulates long-term synaptic depression and learning in adolescent rat hippocampus after two binges of ethanol by modulating GluN2A and GluN2B ratio.

Drissi I., Alary R., Deschamps C., Fouquet G., Marcq I., Debuysscher V., Naassila M., Vilpoux C., Pierrefiche O.

Prix

Prix de communication orale : LARC Neurosciences network, Octobre 2017. Lille

Encadrement

2018 : Encadrement de M^{elle} Chloé Dechamps, étudiante en Master 2

2017 : Participation à l'encadrement de M^{elle} Shadi-Rachel Alary, étudiante en Master 2

2017 : Participation à l'encadrement de M^{elle} Chloé Deschamps, étudiante en Master 1

2016 : Encadrement des apprentis chercheurs MAAD

Enseignement

- **Année universitaire 2016-2017 :**

- 24 heures de travaux pratiques à l'UFR des sciences UPJV Amiens, destinées aux étudiants de licence 2 de biologie et appartenant au module communication et signalisation cellulaire

Mission : J'ai mis en place d'un TP de simulation informatique du potentiel d'action ainsi que les caractéristiques des conductances sodiques et potassiques qui le génèrent. J'ai eu 9 groupes de TP. A la fin de la séance, les étudiants sont évalués à travers un compte rendu que j'ai aussi mis en place. J'ai aussi corrigé l'ensemble des copies des comptes rendu des étudiants et attribué les notes.

- 42 heures de travaux dirigés à l'UFR de sciences humaines et sociales UPJV Amiens, destinées aux étudiants de licence 2 de psychologie et appartenant au module neurosciences.

Mission : J'ai eu 7 groupes, chacun a 3 séances de TD. Ces TDs portent sur la sensorialité. Durant la première séance, je présente brièvement la sensorialité et la perception ainsi que les différents systèmes sensoriels (vision, audition, olfaction et gustation). Au début de la 2eme séance, j'aborde le système vestibulaire et je commence la somesthésie. Je mets l'action sur l'extéroception et la proprioception. Pendant la dernière séance, j'explique la nociception et je termine la séance avec une révision de l'ensemble des séances.

- **Année universitaire 2017-2018 :**

- 24 heures de travaux pratiques à l'UFR des sciences UPJV Amiens, destinées aux étudiants de licence 2 de biologie et appartenant au module communication et signalisation cellulaire. Même programme que l'année précédente.
- 42 heures de travaux dirigés à l'UFR de sciences humaines et sociales UPJV Amiens, destinées aux étudiants de licence 2 de psychologie et appartenant au module neurosciences. Même programme que l'année précédente.

Formations

- 10 heures de formation de médiations et vulgarisation scientifique proposée par l'arbre des connaissances dans le cadre de l'encadrement des apprentis chercheurs, Paris
- Ensemble de formations pédagogiques proposées par l'école doctorale sciences, technologie et santé à l'UPJV, Amiens
- Stage pédagogique durant une semaine au sein du lycée Robert de Luzarches, Amiens
- Formation à l'expérimentation animale et au bien-être animale (ancien niveau 1), à l'UPJV, Amiens

Table des matières

Présentation générale	34
Introduction	40
Chapitre I	41
La consommation d'éthanol comme problème de santé publique	41
I. Introduction	43
II. Différentes formes d'usages d'éthanol.....	44
II.1. Les usages non-problématiques.....	45
II.2. Les usages à problèmes	46
II.3. Consommation aigue d'alcool de type « Binge drinking ».....	47
III. Epidémiologie	48
III.1. Dans la population générale	48
III.2. Chez les adolescents.....	49
IV. Etiologie des TUAs	50
V. Les théories de l'addiction	51
VI. Conséquences de la consommation d'éthanol	52
VII. Conclusion	53
Chapitre II	55
Organisation anatomo-fonctionnelle de l'hippocampe	55
I. L'hippocampe.....	56
I.1. Organisation anatomique de l'hippocampe	56
I.1.1. Les connexions afférentes de l'hippocampe	56
I.1.2. Les aires de la corne d'Ammon	58
I.1.3. Le gyrus denté.....	59
I.1.4. Le circuit synaptique de l'hippocampe	60
I.1.5. Les connexions efférentes de l'hippocampe	60
II. Transmission synaptique dans le réseau hippocampique	60
II.1. La transmission glutamatergique.....	61
II.1.1. Les récepteurs ionotropiques au glutamate.....	61
II.1.2. Les récepteurs métabotropiques au glutamate	67
II.1.3. La transmission GABAergique	68
III. La plasticité synaptique.....	70
III.1. La plasticité synaptique à court terme	71

III.2. La plasticité synaptique à long terme	73
III.2.1. La potentialisation à long terme	75
III.2.1.1. La potentialisation à long terme dépendante du récepteur NMDA.....	75
III.2.1.2. La potentialisation à long terme d'origine présynaptique	80
III.2.2. La plasticité à long terme de type dépression.....	80
III.2.2.1. La dépression à long terme dépendante des récepteurs NMDA.....	81
III.2.2.2. La DLT dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate	84
IV. Le rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA dans la plasticité synaptique	85
IV.1. Rôle des sous unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la PLT	85
IV.2. Rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la DLT	86
V. Modifications des propriétés de plasticité synaptique : La métaplasticité.....	87
V.1. Le ratio GluN2A/GluN2B contrôle la plasticité	87
VI. Plasticité synaptique et apprentissage dans l'hippocampe.....	90
VII. Conclusion	91
Chapitre III	92
.....	92
Les effets de l'éthanol sur l'hippocampe	92
I. Ethanol et transmission glutamatergique dans l'hippocampe	93
II. Ethanol et transmission GABAergique dans l'hippocampe	96
III. Ethanol et plasticité synaptique dans l'hippocampe	97
IV. Conclusion	99
Chapitre IV	101
.....	101
Implication des facteurs épigénétiques et transcriptionnels dans les effets de l'éthanol	101
I. Introduction	102
II. Les facteurs épigénétiques et la mémoire	102
II.1. L'épigénétique	102
II.2. Mécanisme d'acétylation/désacétylation des histones.....	103
II.3. Les HDACs et la mémoire	108
II.4. Le mécanisme acétylation / désacétylation et la réponse aux substances d'abus	111
III. Les facteurs de transcription de type HSF	113
III.1. Introduction	113
III.2. Rôle physiologique des HSFs	114
III.2.1. Rôle de HSF1 dans le système nerveux central	114
III.2.2. Régulation de l'activation d'HSF1	115

III.2.3. Rôle de HSF2 dans le système nerveux central	118
III.2.4. Rôle de HSF2 dans la gamétogénèse	119
III.2.5. Régulation de l'activation de HSF2	119
III.2.6. HSF1, HSF2 et l'EtOH	120
IV. Conclusion	121
Matériels et Méthodes	127
I. Animaux	129
I.1 Modèle de « <i>Binge Drinking-like</i> »	129
I.2 Modèle de consommation chronique d'éthanol en libre choix	130
II. Electrophysiologie	130
II.1 Préparation des tranches d'hippocampe	130
II.2 Enregistrements électrophysiologiques	132
II.3 Analyse des signaux électrophysiologiques	134
III. Tests Comportementaux	135
III.1 Test de reconnaissance de nouvel objet chez le rat adolescent	135
IV. Techniques de biologie cellulaire	136
IV.1. Western Blot	136
IV.2. Immunohistochimie	137
V. Tests statistiques	138
Résultats	140
Article 1	142
Article 2	172
Discussion	206
I. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par l'éthanol	211
II. L'éthanol induit des altérations des processus épigénétiques	214
III. HDAC et mémoire	217
IV. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par les HDACs	219
V. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par les HSFs	220
VI. La transmission glutamatergique en absence de HSF2 ou après alcoolisation	221
VII. Perturbation de la DLT : rôle de la métaplasticité	223
VIII. La DLT comme mécanisme important pour les apprentissages et la mémoire	225
Conclusion générale	229
Résultats annexes	232
Références	239

Liste des figures

Figures introduction

Figure 1: Pyramide des différentes formes d'usage d'éthanol	44
Figure 2: Evolution des ivresses alcooliques à 17 ans en France depuis 2000..	50
Figure 3: Localisation de l'hippocampe chez le rongeur et le primate (humain et non humain).	57
Figure 4: Représentation schématique de l'architecture de l'hippocampe en coupe transversale	57
Figure 5: Le récepteur NMDA : diversité des sous-unités, structure et propriétés.	66
Figure 6: La structure du récepteur GABAA.	69
Figure 7: Les protocoles d'induction de la facilitation et de la dépression à court terme.	72
Figure 8: : La PLT et la DLT dépendantes du récepteur NMDA dans la synapse CA3-CA1.	74
Figure 9: : Le trafic du récepteur AMPA pendant la PLT et la DLT	79
Figure 10: Le protocole d'induction de la DLT dans l'aire CA1 dépend de l'âge.	83
Figure 11: Le modèle théorique de la régulation de la plasticité synaptique par le récepteur NMDA	89
Figure 12: Hypothèse du mécanisme d'action de l'EtOH sur le récepteur GABA-A)	97
Figure 13: Contrôle génétique versus contrôle épigénétique de l'expression génique	104
Figure 14: Représentation schématique d'un nucléosome. Le nucléosome constitue l'unité de base de la chromatine.	104
Figure 15: Acétylation des histones.	106
Figure 16: Balance acétylation / Désacétylation des histones.	107
Figure 17: La TSA, un inhibiteur des HDACs, améliore la PLT	110
Figure 18: Cycle d'activation et d'atténuation de HSF1.	117
Figure 19: Modèle d'action de HSF2 dans les défauts de migration radiale au niveau cortical suite à une exposition prénatale à l'EtOH	122
Figure 20: Protocole d'injection des différents groupes de rats.	130
Figure 21: Protocole type d'une expérience d'électrophysiologie suivie pendant ces travaux de thèse	133
Figure 22: Exemple des signaux enregistrés ainsi que les paramètres analysés	134
Figure 23: Schéma explicatif du test de reconnaissance de nouvel objet chez le rat adolescent	136

Figures article 1

Figure 24: Figure 1: Timeline of the experiments	164
Figure 25: Figure 2: Effect of ethanol, NaB and the combination of both substances on hippocampus synaptic plasticity 48h after the different treatment.	165
Figure 26: Figure 3: NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists, input/output curve and BCM-like curve	166
Figure 27: Figure 4: Performance in novel recognition (NOR) task	167
Figure 28: Figure 5: HDAC2 protein expression and mRNA levels and enzymatic activity 48 h after two binge	168
Figure 29: Figure 6: Acetylated H4 and HDAC2 immunolabelling 48 h after two binge drinking-like exposures and the effects of NaB	169

Figure 30: Figure S1: Effect of ethanol, TSA and the combination of both substances on hippocampus synaptic plasticity 48h after the different treatment	170
Figure 31: Figure S2: Acetylated H4 immunolabelling 48 h after two binge drinking-like exposures and the effects of NaB.....	170

Figures article 2

Figure 32: Figure 1: Lack of hsf2 gene had no effect on CA1 synaptic transmission	194
Figure 33: Figure 2: Effect of lack of HSF2 on bidirectional synaptic plasticity	195
Figure 34: Figure 3: Ethanol consumption and preference.	196
Figure 35: Figure 4: Increased CA1 synaptic transmission in WT mice after ethanol consumption ..	197
Figure 36: Figure 5: Bidirectional synaptic plasticity in WT mice after ethanol consumption	198
Figure 37: Figure 6: CA1 synaptic transmission in HSF2 KO mice after ethanol exposure.	199
Figure 38: Figure 7: Bidirectional synaptic plasticity in <i>hsf2(-/-)</i> mice after ethanol exposure.....	200
Figure 39: Figure 8: Sensitivity of NMDA-fEPSPs to GluN2A and GluN2B antagonists before and after ethanol.	201

Figure discussion

Figure 40: Schéma récapitulatif des principaux résultats de mes travaux de thèse.....	210
----------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figures travaux annexes

Figure 41: Co-immunomarquage de TLR4 et NeuN sur des tranches de CA1 de rats jeunes adultes.	236
Figure 42: Effets de l'éthanol (3g/kg i.p.) et de la combinaison minocycline + N-acetylcystéine couplée ou non à l'EtOH sur la DLT 48.....	237
Figure 43: Enregistrements de la DLT après différents traitement et corrélation avec les résultats des mêmes animaux lors du test d'apprentissage	238

Liste des tables

Tableau 1: Seuil de dangerosité perçus des différentes drogues	44
Tableau 2: Les seuils de consommation d'éthanol correspondant à chaque niveau de risque	45
Tableau 3: Les différents types d'interneurones présents dans la corne d'Ammon ainsi que leurs sites de contact avec le neurone pyramidal	59
Tableau 4: L'effet d'une exposition aigue à l'EtOH sur la PLT in vitro au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe.....	99
Tableau 5: Rôle des HDACs de la classe I dans la mémoire	111
Tableau 6: Concentration en mM des différents constituants des solutions de coupe et du liquide céphalorachidien artificiel (LCRa).....	131
Tableau 7: Anticorps primaires et secondaires utilisées pour le marquage immunohistochimique .	137

Abréviations

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-oxazole-propanoïque

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

API : Alcoolisation ponctuelle importante

BC : Bottle Choice

BCM : Bienenstock-Cooper-Munro

CA : Corne d'Ammon

Ca²⁺ : Ion calcium

CAMKII : protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline

CBP : CREB binding protein

CdK : Cycline-dependent-kinase

Cl⁻ : Ion chlore

DHPG : Dihydroxyphenylglycine

DLT : Dépression à Long Terme

DNMT : DNA méthyltransferase

DSN : Direction du service national

eCB : endocannabinoïde

ERK : Extracellular signal regulated kinase

ESCAPAD : Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel à la Défense

EtOH : Ethanol

GABA : Acide γ aminobutyrique

GD : Gyrus denté

GIRK : G-protein-coupled-inwardly-rectifying K⁺ channel

GSK : Glycogen synthase kinase

HAT : Histone acétyltransférase

HCO³⁻ : Ion bicarbonate

HDAC : Histone désacétylase

HEK : Human embryonic kidney

HFS : High frequency stimulation

HMGB1 : High mobility group box 1

HSF : Heat shock factor

HSP : Heat shock protein

HSR : Heat shock response

I/O : input/output

iGluR : Récepteur ionotropique au glutamate

K⁺ : Ion potassium

KO : Knock out

LFS : Low frequency stimulation

MAGUK : Membrane associated guanylate kinases

Mg²⁺ : Ion magnésium

mGluR : Récepteur métabotrope au glutamate

Mino : Minocycline

Na⁺ : Ion sodium

NaC : N-acétylcystéine

NaB : Sodium butyrate

NIAAA : Institut américain sur l'abus d'alcool et l'alcoolisme

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NOR : Novel object recognition test

NPY : Neuropeptide Y

OFDT : Observatoire français des drogues et des toxicomanies

OMS : Organisation mondiale de la santé

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLT : Potentialisation à Long Terme

PP1 : Protéine phosphatase 1

PPF : Paired pulse facilitation

PP-LFS : Paired pulse low frequency stimulation

PPSE : Potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : Potentiel post-synaptique inhibiteur

PS : Population spike

PSD : Post synaptic density

RB : Protéine rétinoblastome

STDP : Spike time dependent plasticity

TrkB : Récepteur à la protéine kinase B

TSA : Trichostatine A

TUA : Trouble de l'usage d'alcool

WT : Wild type

Zn²⁺ : Ion zinc

Présentation générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif de mieux comprendre les effets d'une alcoolisation aiguë ou chronique sur les mécanismes cellulaires liés à la mémoire et aux apprentissages. La base cellulaire de la mémoire est associée à la plasticité synaptique bidirectionnelle (la potentialisation à long terme -PLT- et la dépression à long terme, DLT) dans une structure cérébrale impliquée dans la fonction de mémorisation appelée l'hippocampe. Depuis des années, les études scientifiques ont montré que ces phénomènes de plasticité sont particulièrement sensibles à l'alcool (EtOH). Cependant, les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la perturbation de la plasticité synaptique suite à la consommation d'EtOH demeurent mal compris.

L'EtOH est une substance psychoactive licite largement consommée en France et dans d'autres pays dans le monde. Dans la population générale en France, 39% de sujets âgés de 18 à 75 ans déclarent avoir consommé, au moins une fois dans la semaine, une boisson alcoolisée (Beck and Richard, 2014) bien que l'on sache que l'EtOH induit des dommages graves sur le fonctionnement du système nerveux central. Chez les jeunes (adolescents et jeunes adultes), un nouveau phénomène est apparu ces dernières années, appelé *binge drinking* très répandu aux Etats Unis et au Royaume-Uni. Ce type de consommation d'EtOH vise principalement à atteindre l'ivresse le plus rapidement possible. Des études chez l'Homme ont montré que la consommation d'EtOH affecte les capacités cognitives comme la mémoire. Par exemple, grâce aux techniques d'imagerie nous savons maintenant que le fonctionnement cérébral lors d'une tâche d'apprentissage est différent chez les adolescents qui pratiquent le binge drinking comparés aux non-bingers. Tout comme la consommation chronique chez l'adulte qui cause aussi des déficits cognitifs graves sur le fonctionnement du système nerveux central et peut induire des maladies incurables comme le syndrome de Korsakoff qui se caractérise par des oublis importants d'une grande partie des informations perçues par les sujets.

La formation de la mémoire et l'acquisition de nombreux apprentissages est basée sur les phénomènes cellulaires de plasticité synaptique dépendants, entre autres, du récepteur

NMDA dans l'hippocampe. L'induction de la PLT et de la DLT dépendantes du récepteur NMDA est influencée par la composition en sous-unités GluN2A et GluN2B composant le récepteur NMDA. De nombreuses études ont montré que ce récepteur est très sensible à l'EtOH ce qui peut induire des perturbations de la plasticité synaptique et donc des apprentissages. Par exemple, une étude antérieure au sein de notre équipe a montré qu'un petit nombre de binge était suffisant pour induire des modifications du signal NMDA en augmentant la sensibilité de la sous-unité GluN2B à son antagoniste spécifique. Ces modifications sont accompagnées d'une réduction de l'amplitude de la DLT et d'un déficit d'apprentissage évalué lors d'un test comportemental chez le rat jeune adulte. Plusieurs études se sont particulièrement intéressées aux modifications de la sous-unité GluN2B sous l'effet de l'EtOH mais peu de travaux ont pris en considération l'effet de l'EtOH sur la sous-unité GluN2A. Récemment, l'étude de Jury et ses collaborateurs a néanmoins montré la participation de la sous-unité GluN2A au développement de la dépendance à l'alcool (Jury et al., 2018), relançant l'intérêt des études sur la sous-unité GluN2A.

D'autre part, de nouvelles hypothèses émergent concernant les modifications de l'épigénome sous l'effet de consommation d'EtOH et l'implication de certains facteurs de transcription dans la régulation génique en réponse à une alcoolisation. Or, les phénomènes de plasticité synaptique peuvent être influencés par des mécanismes épigénétiques ou des régulations d'expression protéique par des facteurs de transcription.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été d'examiner les perturbations affectant la sensibilité du signal NMDA aux antagonistes spécifiques des sous-unités GluN2A et GluN2B ainsi que leurs conséquences sur la plasticité synaptique bidirectionnelle dans l'hippocampe chez le rat et la souris suite à une alcoolisation aigue de type binge-drinking-like chez les rats jeunes adultes ou chronique chez les souris adultes. Le second objectif a été d'étudier les mécanismes épigénétiques et transcriptionnels qui peuvent être impliqués dans les modifications du signal NMDA et de la plasticité synaptique. Dans le cadre d'une consommation de type binge-drinking-like, nous nous sommes particulièrement intéressés au phénomène épigénétique de type acétylation/désacétylation des histones. Les histones sont acétylées par des enzymes particulières appelées histones acétyltransférases (HAT) et désacétylées par les histones désacétylases (HDAC). Cette balance entre acétylation et désacétylation des histones permet de moduler le degré de compaction de l'ADN et de réguler

la transcription des gènes. En ce qui concerne une consommation prolongée d'EtOH, nous avons étudié le rôle d'un facteur de transcription appartenant à la famille des *heat shock factors*, HSF2, dans les modifications des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA ainsi que les perturbations des phénomènes de plasticité synaptique après une alcoolisation chronique chez la souris femelle adulte. En effet, il a été proposé que HSF2 joue un rôle dans les défauts de migration cellulaire au niveau cortical pendant le développement, induits par une alcoolisation fœtale (El Fatimy et al., 2014).

Ainsi, mes travaux de thèse ont abouti à deux études :

- La première étude visait à examiner les effets du binge-drinking sur la sensibilité pharmacologique du signal NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B, sur les phénomènes de plasticité synaptique dépendants de ce récepteur dans l'aire CA1 de l'hippocampe et les apprentissages chez le rat jeune adulte. Cette étude avait aussi pour objectif d'évaluer les modifications épigénétiques de type acétylation et désacétylation des histones sous l'effet du binge-drinking-like et l'implication de ce mécanisme épigénétique dans les modifications de la sensibilité pharmacologique du signal NMDA et la plasticité synaptique.
- La seconde étude avait pour but d'examiner les effets d'une alcoolisation chronique sur les sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA ainsi que sur les phénomènes de plasticité synaptique. Cette étude visait à comprendre l'implication du facteur de transcription HSF2 dans les effets de l'EtOH dans l'aire CA1 de l'hippocampe.

Pour ces études, nous avons utilisé des rats *Sprague Dawley* jeunes adultes soumis au binge-drinking et des souris C57Bl/6 femelles adultes alcoolisées pendant un mois en utilisant un protocole d'alcoolisation en libre choix.

Dans le contexte du binge drinking et de l'implication des mécanismes épigénétiques dans les effets de ce type d'alcoolisation, des rats sains âgés de 45 jours à 55 jours ont été utilisés. Nous avons procédé par une approche pharmacologique visant à inhiber les HDACs de la classe I en utilisant le sodium butyrate (NaB). Nous avons donc formé 4 groupes de rats *i)* un groupe contrôle qui reçoit deux injections de solution physiologique *ii)* un groupe EtOH qui constitue le modèle de binge drinking-like et qui reçoit alors deux injections

intrapéritonéales, d'EtOH à 20% à une dose de 3g/kg à 9 heures d'intervalle *iii*) un groupe recevant deux injections de NaB (600mg/kg) et *iv*) un groupe ayant reçu deux injections d'EtOH à 9 heures d'intervalle chacune précédée d'une injection de NaB 30 minutes avant. Nous avons évalué la capacité d'apprentissage de ces animaux grâce à un test de reconnaissance de nouvel objet et nous avons enregistré les phénomènes de plasticité synaptique de type DLT et PLT sur des tranches de CA1 d'hippocampe dorsal en utilisant la technique d'enregistrement de potentiel de champs. Nous avons aussi examiné les modifications de la sensibilité du signal NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B. L'activité HDAC, les modifications de HDAC2, de ac-H3K9 et ac-H4K12 ont été mesurées par des techniques de RT-qPCR, westernblot et immunohistochimie. Nos résultats montrent que la réduction de la DLT est associée à une augmentation de l'activité HDAC 2, de la quantité d'ARNm et de la protéine HDAC2 et une diminution de ac-H4K12. Les manipulations pharmacologiques ont montré que la balance GluN2A/GluN2B est affectée suite à l'exposition à l'EtOH ce qui pourrait expliquer les altérations de la DLT. De manière intéressante, l'administration de NaB avant les injections d'EtOH prévient les modifications de la balance GluN2A/GluN2B, la réduction de la DLT mais aussi l'échec d'apprentissage lors du test comportemental. En conclusion, les modifications touchant la balance GluN2A/GluN2B après exposition à l'EtOH seraient à l'origine, au moins en partie, des perturbations de la plasticité synaptique et des troubles d'apprentissage et ce en impliquant des mécanismes épigénétiques.

Lors de la seconde étude, nous avons utilisé des souris sauvages (WT) et des souris transgéniques knock-out (KO HSF2) pour le gène *hsf2* (âgées de 90 à 110 jours) et enregistré la transmission et la plasticité synaptique sur des tranches aiguës de CA1 d'hippocampe en utilisant la technique de potentiel de champs avant et après une exposition à l'EtOH pendant un mois via un protocole de consommation en libre choix. Afin d'étudier d'éventuelles modifications du récepteur NMDA, nous avons évalué la sensibilité du signal NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B. Nos résultats montrent qu'avant toute exposition à l'EtOH, les souris KO HSF2 ne présentent pas de différence de transmission synaptique comparées aux souris WT. En revanche, pour un même protocole électrique, la DLT présente chez les WT, est abolie chez les souris KO HSF2. De plus, l'analyse de la sensibilité des signaux GluN2A et GluN2B à leurs antagonistes respectifs montrent que chez les souris KO HSF2, l'antagoniste de la sous-unité GluN2B est plus efficace que chez les WT. A l'inverse,

l'antagoniste de la sous-unité GluN2A est plus efficace chez les souris WT que chez les KO HSF2 indiquant ainsi une mauvaise balance des signaux GluN2A/GluN2B chez les souris KO HSF2. Ensuite, nous avons exposé les souris à l'EtOH. L'analyse de la consommation et de la préférence d'EtOH montre que les souris KO HSF2 ne présentent pas de différences significatives comparées aux souris WT. L'analyse des enregistrements électrophysiologiques par contre, montrent que l'exposition à l'EtOH augmente la transmission synaptique chez les WT, abolie la DLT et augmente la sensibilité du récepteur NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B. De manière intéressante, les souris KO HSF2 sont insensibles aux effets de l'EtOH sur la transmission et la plasticité synaptique. De plus l'exposition à l'EtOH augmente plutôt le signal GluN2A chez les souris KO HSF2. Cette étude montre pour la première fois que HSF2 participe, probablement, à la régulation de l'équipement membranaire en récepteur NMDA des neurones pyramidaux de CA1 et la sensibilité pharmacologique du signal NMDA en réponse à une exposition chronique à l'EtOH.

Par conséquent, l'ensemble de mes travaux de thèse montre que quel que soit le type d'alcoolisation, aiguë ou chronique, mais aussi l'espèce animale utilisée, rat ou souris, l'EtOH induit des adaptations du réseau hippocampique en altérant la balance de la sensibilité pharmacologique du signal NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B et ce en mettant en jeu des facteurs épigénétiques et transcriptionnels.

Ainsi dans ce manuscrit seront abordés dans un premier chapitre les différentes formes de consommation d'EtOH, les résultats des enquêtes épidémiologiques et les conséquences de ces consommations sur le cerveau. Dans le second chapitre, je présenterai l'anatomie détaillée de l'hippocampe. Je décrirai aussi les récepteurs au glutamate et les différentes formes de plasticité synaptique en mettant l'accent sur la plasticité dépendante du récepteur NMDA au niveau de l'hippocampe. Dans le troisième chapitre, je donnerai des données de la littérature montrant l'effet de l'EtOH sur les récepteurs ionotropiques au glutamate et la plasticité synaptique. Puisque nous nous intéresserons aux mécanismes épigénétiques et transcriptionnels, je décrirai la balance d'acétylation/désacétylation des histones et son rôle dans la réponse à l'EtOH, puis j'évoquerai les facteurs de transcription de type HSF ainsi que leurs rôles physiologiques. Par la suite, après avoir présenté nos questions scientifiques et abordé notre méthodologie, je présenterai nos résultats sous formes de deux articles scientifiques dont un soumis dans le journal « *addiction biology* ». Dans le chapitre suivant, je

discuterai nos résultats et je présenterai les limites des études et des perspectives de travail avant de conclure cette thèse. A la fin, je présenterai aussi des résultats annexes obtenus dans le cadre d'une étude en collaboration avec des membres du laboratoire GRAP et dont les expériences sont toujours en cours.

Introduction

Chapitre I

La consommation d'éthanol comme problème de santé publique

I. Introduction

En Europe, comme dans de nombreux pays à travers le monde, l'alcool occupe une place importante. Cette substance psychoactive licite est consommée au cours de nombreuses occasions, elle est généralement associée au plaisir d'une consommation sociale, festive et conviviale. Pourtant, la molécule d'alcool, appelée éthanol (EtOH) de formule chimique $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, répond à tous les critères connus pour l'identifier comme une substance d'abus. Par exemple son action sur le système nerveux central et son effet psychotrope et addictogène. Les conséquences de l'abus d'EtOH sont parfois dramatiques impactant la santé des consommateurs, affectant aussi leur production au travail et leur qualité de vie. De plus, sa consommation en grande quantité constitue un enjeu majeur de santé publique. Afin d'appuyer ces constatations, l'étude de David Nutt (2010) réalisée au Royaume-Uni a montré que l'EtOH présente le score de dommage sanitaire et socioéconomique, tout confondu, le plus élevé comparé aux autres substances d'abus (héroïne, cocaïne et ecstasy) (Nutt et al., 2010). Malgré la connaissance que nous avons de ces dommages, la consommation d'EtOH reste banalisée dans nos sociétés et n'est considérée dangereuse que par 30% des adolescents âgés de 15 ans et plus (Perceptions et opinions des Français sur les drogues). De plus, pour 73% des français, la consommation d'alcool n'est dangereuse que lorsqu'elle dépasse 3 à 4 verres par jour (tableau 1).

Dans ce chapitre je présenterai les différents types d'exposition à l'EtOH. Je décrirai aussi le « binge drinking », une modalité de consommation rapide et importante d'EtOH de plus en plus répandue en France et j'exposerai les résultats des travaux visant à étudier les conséquences des différentes modalités de consommation d'EtOH.

	HEROÏNE			COCAÏNE			CANNABIS			TABAC			ALCOOL		
	2002	2008	2013	2002	2008	2013	2002	2008	2013	2002	2008	2013	2002	2008	2013
%															
Dangereux dès qu'on essaye	87	92	90	82	88	85	51	62	54	25	43	41	5	10	11
Dangereux selon la quantité en une seule occasion*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	15	8	6
Dangereux même en consommation occasionnelle	6	4	4	8	6	7	12	13	15	0	12	10	1	10	11
Dangereux seulement en consommation quotidienne	6	4	6	8	6	8	33	25	30	73	44	47	77	72	74
Ce n'est jamais dangereux	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	1

Tableau 1: Seuil de dangerosité perçus des différentes drogues

II. Différentes formes d'usages d'éthanol

Chez l'adulte, la consommation d'EtOH est définie selon cinq catégories d'usage : les catégories « non-usage » et « usage » sont considérées comme des catégories de consommation non problématique. En revanche, les catégories d'« usage à risque », « d'usage nocif » et « d'usage avec dépendance » forment l'ensemble des mésusages (figure 1). Afin de limiter les dommages induits par la consommation d'EtOH, il est important de détecter le plus tôt possible les usages problématiques. Ceci permet de prévenir au mieux les premiers dommages mais aussi de limiter le risque de tomber dans une dépendance.

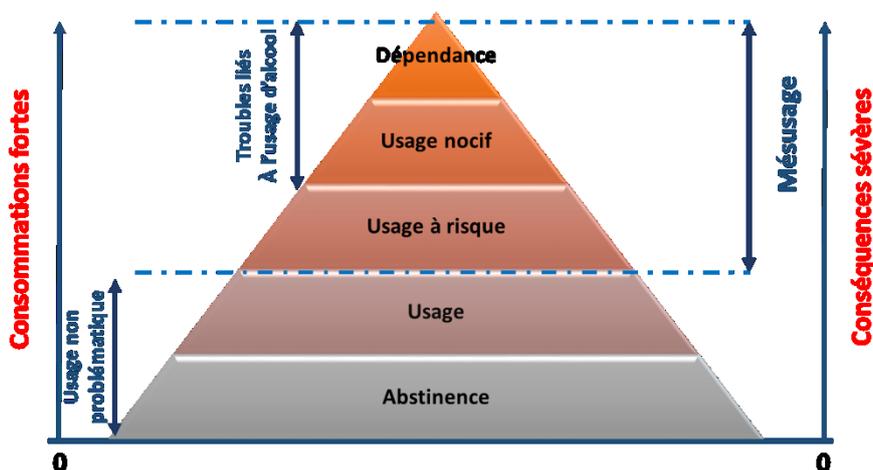


Figure 1: Pyramide des différentes formes d'usage d'éthanol

(Adapté d'après Naassila., 2018)

II.I. Les usages non-problématiques

La première catégorie est le non-usage. Celle-ci est caractérisée par l'absence de consommation d'éthanol. Lorsque le non-usage prend la suite d'une dépendance, on parle alors d'abstinence.

L'usage est une consommation sociale qui peut être expérimentale, occasionnelle ou régulière. Cette forme de consommation est depuis longtemps considérée comme acceptable pour l'individu et la société. Comme il existe une forte corrélation entre la quantité d'EtOH consommée et le risque de développer une dépendance et de subir ou d'infliger des dommages, les Etats ont établis des seuils de consommations dans le but de donner des repères aux usagers. De fait, l'agence européenne du médicament, en se basant sur les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a proposé des seuils de consommation ponctuelle illustrés dans le tableau 2.

Risque	homme	femme
Faible	1 à 40 g d'éthanol	1 à 20g d'éthanol
Modéré	41 à 60 g d'éthanol	21 à 40 g d'éthanol
Elevé	61 à 100 g d'éthanol	41 à 61 g d'éthanol
Très élevé	101 g d'éthanol et plus	61 g d'éthanol et plus

Tableau 2: Les seuils de consommation d'éthanol correspondant à chaque niveau de risque

(Adapté d'après Naassila., 2018)

En France, le seuil de faible risque associé à un usage ponctuel correspond à une consommation qui ne dépasse pas quatre verres par occasion. En ce qui concerne un usage régulier, le seuil de faible risque correspond à une consommation de 21 verres par semaine chez l'homme (ce qui équivaut à 3 verres par jour pour un consommateur régulier) et 14 verres par semaines chez la femme (2 verres par jour pour une consommatrice régulière) (Naassila, 2017). Cependant, la situation évolue et face à divers travaux récents, Santé Publique France et l'institut du cancer ont publié le 4 mai 2017 de nouvelles recommandations sur la consommation des boissons alcoolisées en recommandant de ne pas consommer plus de 10

verres standards par semaine et plus de deux verres standards par jour et d'avoir des jours dans la semaine sans consommation. Néanmoins, même ces faibles niveaux de consommations peuvent être responsables de développement de cancer ou de troubles neurologiques. En effet, une étude montre qu'une consommation d'un seul verre par jour (10 à 20g d'EtOH pur) constitue déjà un risque de développer un cancer (Braillon, 2018). De plus, une récente étude publiée dans le journal « *The Lancet* » réalisée à l'échelle nationale et qui a pris en compte un très grand nombre de patients admis dans différents hôpitaux français pour des troubles d'usage d'alcool (TUA), a révélé que même un faible niveau de consommation d'EtOH pourrait être responsable des démences précoces (Schwarzinger et al., 2018). Encore plus alarmant, une grande étude également publiée dans le journal « *The Lancet* » et réalisée à grande échelle sur 195 pays a montré qu'il n'y a pas de consommation d'EtOH sans risque, même un faible niveau de consommation quotidienne représente un risque de développer un cancer, des maladies cardiovasculaires ou encore le diabète (GBD 2016 Alcohol Collaborators, 2018).

II.2. Les usages à problèmes

Les usages à risque

Tout usage, ponctuel ou régulier, présentant un risque supérieur au seuil de risque faible est considéré comme un usage à risque. Ces consommations sont susceptibles d'induire des dommages médicaux, psychologiques mais aussi sociaux. Par exemple, les niveaux de consommation à risque très élevé sont généralement associés à des conséquences graves. En effet, une consommation de 101g d'EtOH pur et plus chez l'homme ou 61g d'EtOH pur chez la femme est responsable de 54% de l'ensemble des formes de cirrhoses, 44% de toutes les causes de pancréatites, 18% de tous les cancers colorectaux, 25% de tous les cancers de l'œsophage, 41% de tous les cancers de la cavité orale et 10% de tous les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques (Naassila, 2017).

Les usages nocifs

Les usages nocifs correspondent à une consommation d'EtOH sans dépendance mais qui induit au moins un dommage médical, psychologique ou social. Ainsi, la définition d'un usage

nocif ne se base pas sur la quantité d'EtOH consommée mais plutôt sur les dommages causés par cette consommation. Comme l'usage à risque, l'usage nocif est aussi associé à une mortalité prématurée, le développement de maladies comme des cirrhoses et des cancers mais aussi des troubles psychiatriques.

Les usages avec dépendance

Ce type d'usage est caractérisé par une perte de maîtrise de la consommation qui mène à une dépendance à l'EtOH. A l'arrêt de la consommation, l'alcoolodépendance s'accompagne d'un syndrome de sevrage qui se caractérise par de l'anxiété, des tremblements, une agitation, une dépression, des nausées et un état de malaise.

II.3. Consommation aigüe d'alcool de type « Binge drinking »

Dans les années 1990, Wechsler et ses collaborateurs ont introduit le terme de « *binge drinking* » pour désigner la consommation d'une grande quantité d'EtOH en une seule occasion (Wechsler et al., 1994; Wechsler and Isaac, 1992). Depuis, ce terme est utilisé aussi bien par le grand public que par la communauté scientifique. En France, le *binge drinking* est aussi appelé alcoolisation ponctuelle importante (API) ("Inpes - Actualités 2015). Cependant, de nombreuses définitions de *binge drinking* ont été établies. Ce type de consommation d'EtOH vise principalement à atteindre l'ivresse le plus rapidement possible (Naassila, 2018; Rolland and Naassila, 2017). D'après les recommandations de l'OMS, le *binge drinking* correspond à la consommation de 50g d'alcool en une seule occasion. Cela correspond en pratique à une quantité d'alcool équivalente aux trois-quarts d'une bouteille de vin de 75 cl. Cette définition est l'une des plus utilisées dans les études épidémiologiques internationale sur le *binge drinking*. Une autre définition a été proposée par l'Institut Américain sur l'Abus d'Alcool et l'Alcoolisme (NIAAA) qui consiste en une consommation d'au moins 56g d'alcool pur chez les femmes et 70g chez les hommes en moins de deux heures et avec une alcoolémie d'au moins 0,8 g/L. A noter que la concentration d'alcool pur dans un verre standard est différente d'un pays à l'autre. En effet, le verre standard américain contient 14g d'alcool pur, alors que son équivalent pour l'OMS (et en France) n'en contient que 10g. Le fait de consommer cette quantité en moins de deux heures suppose une recherche d'ivresse qui n'est pas forcément présente pour les critères de l'OMS pour lesquels il n'y a pas de contrainte de

temps. De plus, ces définitions ne prennent pas en considération la fréquence de la consommation et la durée de pratique de ce comportement. Ainsi, Townshend et Duka, en Angleterre, ont donné une définition plus comportementale. Ils ont proposé un score de binge qui se calcule principalement sur le critère de vitesse de consommation (c'est-à-dire le nombre de verres consommés par heure) mais aussi le nombre d'ivresse et le nombre de fois où l'on consomme jusqu'à l'ivresse au cours des six derniers mois. Avec un score > 24, le consommateur est catégorisé « *binge drinker* » (Townshend and Duka, 2002). Ce score permet d'étudier les déterminants individuels et environnementaux du *binge drinking* ainsi que ses conséquences sur le fonctionnement cérébral.

III. Epidémiologie

Avant d'entamer ce chapitre, Il est important de noter que la France est un pays où la tradition viticole est fortement ancrée. Au niveau mondial, les français sont les premiers consommateurs mais aussi producteurs de vin. Le commerce de boissons alcoolisées représente 22,1 milliards d'euros pour notre pays en 2011. Bien que la prise en charge des TUAs occupe une place importante dans la santé publique en France, notre pays reste malgré tout tiraillé entre protection des populations, sauvegarde d'emplois et recette fiscale.

III.1. Dans la population générale

La prévalence de la consommation d'alcool varie d'un pays à l'autre. En France, en 2011, on estime qu'un adulte (âgé > 15ans) consomme 12 litres d'EtOH pur par an. Cette quantité correspond à une moyenne de 2,6 verres de boisson alcoolisée par jour. Rappelons qu'en France, une unité d'alcool, contient 10g d'EtOH pur ce qui correspond approximativement à la quantité d'EtOH contenue dans un verre standard de toutes boissons alcoolisées servies dans un établissement de consommation autorisés à vendre de l'alcool. Mais la quantité d'alcool consommée varie selon le type de boisson, en effet la consommation de vin en France représente 58 % des quantités totales d'alcool pur contenues dans les boissons alcoolisées. Les spiritueux en représentent 22 % et la bière un peu plus de 17 %. Le reste (2,5 %) est consommé sous forme de cidre et de produits intermédiaires (mélanges de spiritueux et de

vins) (Palle, 2013). En 2014, l'étude de Beck et de ses collaborateurs a montré que dans une population de sujets âgés de 18 à 75 ans en France, seulement 13% ne consomment pas de boisson alcoolisée. En revanche, 10% des sujets interrogés ont déclaré avoir une consommation quotidienne d'alcool et 39% avoir consommé au moins une fois dans la semaine une boisson alcoolisée (Beck and Richard, 2014). La consommation de boissons alcoolisées reste plus importante chez les hommes. Ceux-ci sont en effet, trois fois plus nombreux à être des buveurs quotidiens (15 % contre 5 % parmi les femmes) et près de deux fois plus nombreux à en faire un usage au moins hebdomadaire (63 % contre 36 %). Quel que soit l'âge, les femmes sont donc globalement moins nombreuses à consommer comparées aux hommes.

III.2. Chez les adolescents

L'adolescence est une période marquée par une augmentation du risque d'expérimentation d'EtOH avec probablement une stabilisation de la consommation à des niveaux assez élevés (Squeglia et al., 2012). En France, comme dans de nombreux autres pays, l'expérimentation et la consommation d'alcool ainsi que l'ivresse survient principalement pendant l'adolescence (ESCAPAD 2011). L'expansion de cette forme de consommation d'EtOH a incité l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT) en collaboration avec la Direction du Service National (DSN) à lancer une série d'enquêtes intitulées « Enquête sur la Santé et les Consommations lors de l'Appel de la Préparation À la Défense (ESCAPAD) depuis 2000. Menée dans le cadre de la journée de défense et de citoyenneté, cette enquête consiste en un questionnaire destiné à des jeunes de 17 ans concernant leur santé et leur consommation de produits psychoactifs. Cette enquête permet d'étudier à une grande échelle le mode de consommation et la quantité de la substance d'abus consommée par les jeunes garçons et filles en France métropolitaine ainsi que dans les départements d'outre-mer. En 2017, les résultats de l'enquête ESCAPAD ont révélé que 44% des jeunes de 17 ans ont eu un épisode de *binge drinking* un mois avant la réalisation de l'enquête ; 16,4% des jeunes ont déclaré avoir pratiqué des épisodes répétés de *binge drinking* (au moins trois épisodes au cours du mois précédant l'enquête). Les épisodes réguliers de *binge drinking* (au moins 10 épisodes au cours du mois précédant l'enquête) ne concerne que 2,7% des jeunes. Ces résultats sont en

baisse par rapport à l'année 2014. En revanche, la baisse continue de l'expérimentation d'EtOH à 17 ans observée depuis 2000 n'a pas donné lieu à un recul des usages réguliers dont les tendances ont été plus fluctuantes.

Il est important de noter que le comportement de pratique du *binge drinking* est également retrouvé dans d'autres tranches d'âge. Selon le Baromètre Santé INPES 2014, 10% des jeunes âgés de 25-35 et 6% des personnes âgées de 35 à 44 ans ont pratiqué le *binge drinking* au moins une fois au cours de l'année suggérant que le *binge drinking* concerne toutes les tranches d'âge de la population.

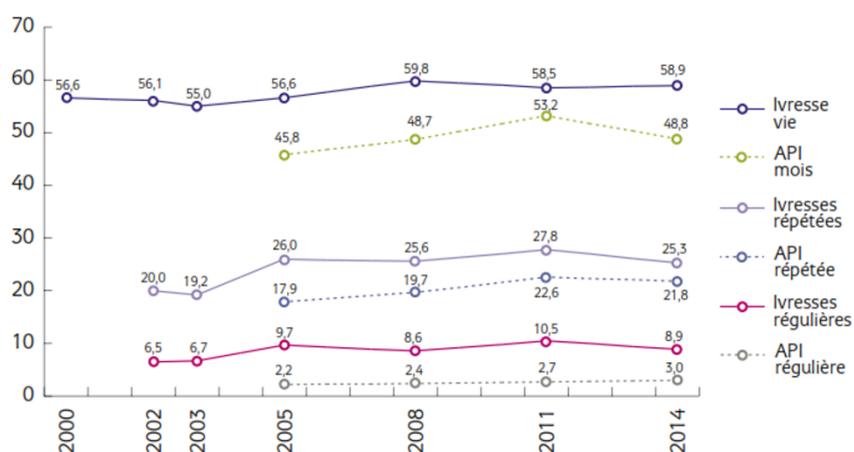


Figure 2: Evolution des ivresses alcooliques à 17 ans en France depuis 2000. *Ivresse vie* : au moins une ivresse dans la vie. *Ivresse répétée* : au moins 3 ivresses dans l'année. *Ivresse régulière* : au moins 10 ivresses dans l'année. *API répétée* : au moins 3 épisodes de binge drinking dans le mois. *API régulière* : au moins 10 épisodes de binge drinking dans le mois (D'après l'enquête ESCAPAD, OFDT., 2000).

IV. Etiologie des TUA

La pathogénicité des TUA demeure mal comprise. Différents facteurs contribueraient à développer les TUA. Ces facteurs peuvent être de nature environnementale ou génétique. Certains troubles de l'humeur, comme la dépression ou l'anxiété, peuvent aussi être associés au développement des TUA (Nehring and Gossman, 2018). L'âge de la première exposition à l'alcool est aussi un facteur de risque important pour développer des TUA. Par exemple, l'exposition intra-utérine multiplie par quatre à cinq le risque de développer un TUA à l'âge

adulte et l'exposition pendant la préadolescence (de dix à quinze ans) multiplie par deux ce risque (Naassila, 2017). En outre, le déterminisme génétique peut rendre une personne plus vulnérable à développer des TUA comparé à d'autres.

V. Les théories de l'addiction

Plusieurs théories ont été proposées visant à expliquer pourquoi certaines personnes ont tendance à consommer de l'EtOH et à développer des TUA. Parmi les théories les plus acceptées au sein de la communauté scientifique nous avons le modèle de renforcement positif proposé par Wise dans les années 1970. Ce modèle suggère que l'initiation de la consommation d'alcool est basée sur des phénomènes de recherche de plaisir (Wise, 1978). Un autre modèle a été décrit par Solomon et Corbit, toujours dans les années 1970. Celui-ci concerne la dérégulation de l'homéostasie hédonique. Selon cette théorie, le plaisir ressenti après une expérience émotionnelle positive donne toujours naissance à une contre expérience provoquant une sensation de déplaisir (Solomon and Corbit, 1974). En effet, la consommation aiguë d'une drogue provoque des sensations euphorisantes qui, suite à la répétition des épisodes de consommation, seront contrebalancées par des processus adaptatifs au niveau du circuit cérébral de la récompense. De fait, lors d'une abstinence prolongée, les processus d'adaptation au niveau du système nerveux central persistent provoquant un nouvel état d'homéostasie, appelé allostasie (Alozai and Sharma, 2018; Koob and Le Moal, 2001). Récemment, les TUA, notamment l'addiction, ont été considérés comme une forme d'apprentissage pathologique qui serait due à l'activation de certains circuits cérébraux impliqués dans la mémoire de récompense. L'activation de ces circuits permettrait d'établir une association aberrante entre la consommation d'EtOH et les stimuli environnementaux présents lors de la consommation (Robinson and Berridge, 2003). Une dernière théorie a été proposée dans les années 1990 par Robinson et Berridge appelée la théorie de la sensibilisation à la valeur incitatrice d'une drogue, et qui stipule qu'une consommation répétée et intermittente d'une substance, induit, par un phénomène de sensibilisation, des modifications neurochimiques rendant les circuits neuronaux hyper-réactifs aux effets des substances d'abus et des stimuli qui leurs sont associés (Robinson and Berridge, 2003).

VI. Conséquences de la consommation d'éthanol

D'un point de vue général, l'abus d'alcool est associé à une dégradation du fonctionnement cognitif. Dans certaines tâches cognitives, la diminution de la performance est particulièrement prononcée chez les jeunes *binge-drinkers*. Plusieurs études en imagerie montrent que les personnes, et particulièrement les jeunes, *binge-drinkers*, consommateurs excessifs d'éthanol ou alcoolodépendants présentent des atteintes cérébrales au niveau des structures frontales et temporales internes.

Les conséquences immédiates du *binge-drinking* sont nombreuses. Outre le coma éthylique dans les cas les plus extrêmes, les pancréatites aiguës, la perte de contrôle engendrant de nombreux accidents de la route ou encore des violences sexuelles, le *binge drinking* entraîne une perte de mémoire appelée « *blackout* ». Ce dernier est défini comme étant une amnésie sans perte de conscience apparaissant essentiellement du fait d'un épisode alcoolique (Gilmore et al., 2018; Jennison and Johnson, 1994). En effet, l'étude de Acheson en 1998 réalisée chez des sujets âgés de 21 à 29 ans a montré que l' EtOH perturbe la mémoire sémantique et faciale et que l'effet est encore plus marquant dans la tranche d'âge de 21 à 24 ans (Acheson et al., 1998). Sur le long terme, des études montrent que la consommation d'éthanol chez les jeunes peut induire une diminution du volume de certaines structures cérébrales comme par exemple l'hippocampe (Nagel et al., 2005). D'autres études chez l'Homme, en utilisant les techniques d'imagerie cérébrale, ont permis d'établir une relation entre le *binge-drinking* et la réduction de la substance blanche dans différentes régions cérébrales (McQueeney et al., 2009) ainsi qu'une diminution de la taille du cervelet (Lisdahl et al., 2013b), de l'épaisseur du cortex (Lisdahl et al., 2013a) ainsi que des altérations des activités cérébrales mesurées par électroencéphalogramme (Courtney and Polich, 2010).

La consommation chronique d'EtOH affecte aussi la mémoire en engendrant certains troubles neurologiques comme l'encéphalopathie de Gayet-Wernicke. Ce trouble est caractérisé par une ataxie, une ophtalmoplégie et une perte de la mémoire à court terme. Le risque de mortalité suite à l'atteinte de ce trouble est de 17%. En revanche 80% des survivants de l'encéphalopathie de Gayet-Wernicke développent le syndrome sévère et permanent de Korsakoff (Nehring and Gossman, 2018). Ce syndrome, aussi appelé « syndrome amnésique »

ou de « démence de Korsakoff », est un trouble neurologique qui se caractérise par des oublis importants d'une grande partie des informations perçues par les patients. Cette amnésie peut être antérograde, concernant les informations reçues suite au développement du syndrome, ou rétrograde touchant les informations stockées avant l'installation du syndrome (Kopelman et al., 2009).

En conclusion, quel que soit la modalité de consommation d'EtOH, des altérations de la mémoire ont été observées chez les consommateurs. Rappelons que l'hippocampe est une structure cérébrale clé dans les apprentissages et les tâches de mémorisation, et de nombreuses études d'imagerie ont montré que la consommation d'EtOH engendre une réduction du volume de l'hippocampe. Ce résultat a été observé chez les sujets jeunes et les sujets adultes, femmes et hommes et suite aux différentes modalités de consommation d'EtOH (Pfefferbaum et al., 2000; Wilson et al., 2017; Zahr and Pfefferbaum, 2017). Chez l'animal (le rat) aussi l'exposition prolongée à l'EtOH induit une perte neuronale dans l'hippocampe (Bengoechea and Gonzalo, 1991). Dans un modèle de *binge drinking*, l'EtOH induit une perturbation de la plasticité synaptique, base cellulaire des apprentissages, au niveau de l'hippocampe accompagnée d'un échec des animaux alcoolisés dans un test d'apprentissage (Silvestre de Ferron et al., 2015). A l'échelle neuronale, l'EtOH perturbe le fonctionnement des neurones pyramidaux de l'hippocampe en altérant l'activité de certaines conductances intrinsèques ainsi que les récepteurs canaux de type NMDA et GABA (Hermens and Lagopoulos, 2018; Risher et al., 2015).

VII. Conclusion

En dépit des dommages importants qu'elle cause, la consommation d'EtOH est banalisée dans notre société chez les jeunes et les adultes. Les dommages de l'EtOH touchent différents organes dont le cerveau en affectant particulièrement les capacités d'apprentissage et de mémorisation. Les études d'imagerie chez l'Homme ont permis d'établir une corrélation entre consommation d'EtOH et diminution du volume de l'hippocampe, structure cérébrale importante pour les processus d'apprentissage. Chez les modèles animaux, en utilisant des techniques invasives, les travaux de recherche montrent que l'EtOH est capable de modifier l'expression et la régulation d'un grand nombre de protéines impliqués dans différents

processus cognitifs incluant la mémoire. Néanmoins, le mécanisme exact à la base des perturbations des phénomènes d'apprentissage sous l'effet de l'EtOH demeure mal compris.

Chapitre II

Organisation anatomo- fonctionnelle de l'hippocampe

I. L'hippocampe

I.1. Organisation anatomique de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure appartenant au système limbique. Le système limbique, comme décrit par James Papez dans les années 1930, est un ensemble de structures corticales et sous-corticales fortement connectées et constitué de l'hippocampe, des cortex entorhinal et cingulaire, du thalamus, de l'hypothalamus, des noyaux septaux, du noyau accumbens, du rhinencéphale et de l'insula. Cet ensemble de régions cérébrales participe, principalement, à l'intégration et à la régulation des processus émotionnels et mnésiques. L'hippocampe, au sein du système limbique, est le siège de la mémoire épisodique et spatiale (Maguire et al., 1998). Chez le rat, l'hippocampe est localisé le long de l'axe rostro-caudal (Figure 3) alors que chez le primate il est localisé au sein du lobe temporal (Figure 3). Sur une coupe transversale, on distingue dans l'hippocampe deux régions interconnectées et emboîtées l'une dans l'autre : la corne d'Ammon (CA, *cornus ammonis*) et le Gyrus Denté (GD aussi appelé *fascia dentata*). Chez le rat la corne d'Ammon est subdivisée en trois aires : CA1, CA2 et CA3. La distinction entre ces aires est basée sur la morphologie des cellules et des afférences qui les constituent. Chez l'Homme, il existe une quatrième sous-division, le CA4, qui est située entre les deux bandes du gyrus denté (Strange et al., 2014).

I.1.1. Les connexions afférentes de l'hippocampe

L'hippocampe reçoit des afférences principalement au travers de deux voies *i)* la voie perforante et *ii)* le fornix (Figure 4). La voie perforante provient du cortex entorhinal. Ce dernier reçoit des afférences des cortex préfrontal, cingulaire, temporal et pyriforme mais aussi de l'amygdale, du pré-subiculum, des aires pariétales, visuelles et olfactives. Le *fornix* quant à lui est issu du septum médian et du thalamus antérieur. A ce dernier circuit s'ajoutent les fibres commissurales venant de l'hippocampe controlatéral et formant la *fimbria*.

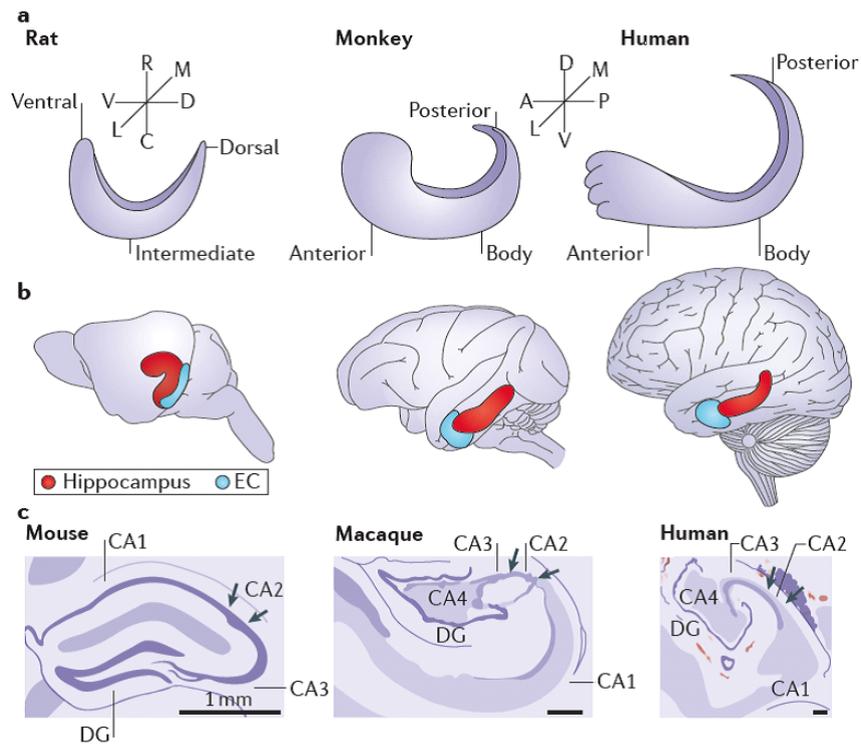


Figure 3: Localisation de l'hippocampe chez le rongeur et le primate (humain et non humain). **a)** Illustration schématique de l'orientation de l'hippocampe sur l'axe rostro-caudal chez le rongeur qui correspond à l'axe antéro-postérieure chez le primate. **b)** La totalité de l'hippocampe est visible (en rouge) associée au cortex entorhinal (en bleu). **c)** Coloration de Nissl sur section d'hippocampe de rongeur et de primates montrant les différentes régions de l'hippocampe. (D'après Strange et al., 2014,)

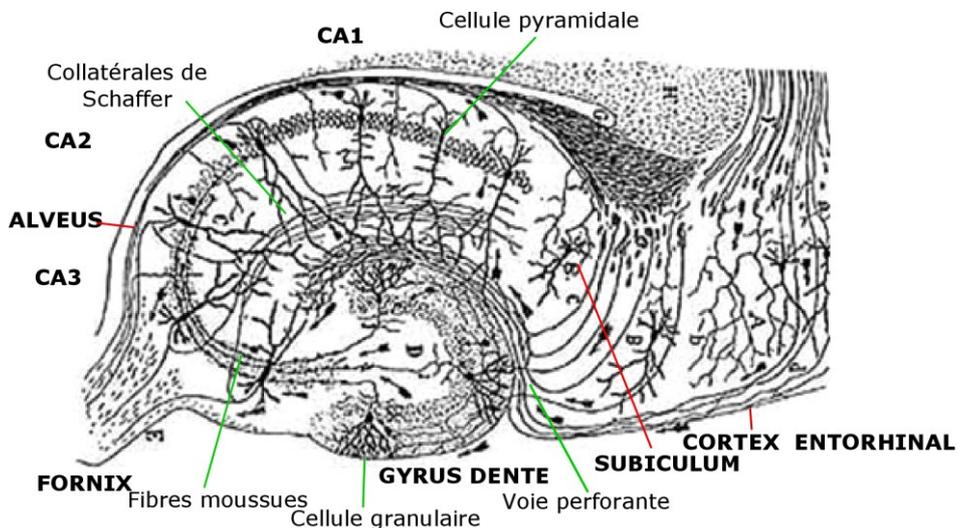


Figure 4: Représentation schématique de l'architecture de l'hippocampe en coupe transversale (Illustration modifiée, d'après Ramon y Cajal, 1911).

I.1.2. Les aires de la corne d'Ammon

La corne d'Ammon est une structure incurvée possédant une organisation laminaire en cinq couches. Au regard de sa forme en « U », la région CA1 se trouve au-dessus de la région CA3 (Figure 4). Les cornes d'Ammon sont constituées principalement de cellules pyramidales formant une population homogène utilisant le glutamate comme neurotransmetteur. Le nom « pyramidale » fait référence à la forme triangulaire de leurs corps cellulaires qui forment une couche facilement identifiable : le *stratum pyramidale*. Trois principales dendrites émergent du corps cellulaire des cellules pyramidales : une dendrite apicale et deux dendrites basales. La dendrite apicale s'étend dans le *stratum radiatum* et possède une arborisation dans le *stratum moleculare/lacunosum*. Les arborisations des dendrites basales se trouvent dans le *stratum oriens*. Concernant l'axone des neurones pyramidaux, celui-ci émet plusieurs ramifications au niveau du *stratum alveus* avant de quitter l'hippocampe (Figure 4) (Hammond, 2014). L'activité des neurones pyramidaux est d'abord régulée par les afférences glutamatergiques qu'elles reçoivent d'autres neurones pyramidaux de l'hippocampe mais aussi par les afférences GABAergiques des interneurons locaux. Au niveau de la corne d'Ammon les interneurons représentent environ 10% de la population totale des neurones et peuvent être classés en fonction de leur site de contact avec le neurone pyramidal (tableau 3) (Freund and Buzsáki, 1996; Maccaferri, 2005; Maccaferri and Lacaille, 2003; Takács et al., 2015). L'activation de ces interneurons inhibiteurs se fait via des afférences extra-hippocampiques (activation antérograde) générant une inhibition antérograde sur les cellules pyramidales ou bien, par le biais des collatérales issues des cellules pyramidales de la même région selon une activation rétrograde, générant ainsi une inhibition rétrograde (Buzsáki, 1984).

Interneurone	Site d'innervation du neurone pyramidal
Cellules en panier	Innervation des dendrites proximale au niveau du stratum pyramidale et radiatum
Cellules bi-stratifiées	Innervation des dendrites apicales et basales au niveau du stratum radiatum et oriens
Cellules oriens-lacunosum-moléculaire	Innervation des dendrites apicales distales au niveau du stratum lacunosum molecular
Cellules axo-axonales	Innervation exclusive du segment initial de l'axone au niveau du stratum pyramidale

Tableau 3: Les différents types d'interneurones présents dans la corne d'Ammon ainsi que leurs sites de contact avec le neurone pyramidal. (Hammond, 2014)

I.1.3. Le gyrus denté

Comme la corne d'Ammon, le gyrus denté (GD) est aussi une structure incurvée en forme de « U » mais elle est organisée en 3 couches seulement (Figure 4). Les cellules granulaires sont les cellules principales qui composent le GD, leurs corps cellulaires sont localisés au niveau du *stratum granulosum* et comme leur nom l'indique, ces cellules sont de forme plus sphérique que les cellules pyramidales. Les dendrites des cellules granulaires émergent à partir du pôle apical du corps cellulaire et forme la couche moléculaire. Les axones des cellules granulaires, appelés fibres moussues, sont dépourvus de myéline et forment une couche propre au GD appelée le *stratum lucidum*. Ces axones partent du pôle basal du corps cellulaire des cellules granulaires, traversent la couche appelée *hilus*, où ils émettent plusieurs prolongements qui contactent des interneurones locaux. Ensuite ils se dirigent vers la région CA3 pour former des synapses avec les neurones pyramidaux de cette région. Les mêmes types d'interneurones GABAergiques décrits au niveau de la corne d'Ammon ont été décrits dans le GD (Amaral, 1993; Strien et al., 2009).

I.1.4. Le circuit synaptique de l'hippocampe

Le circuit de l'hippocampe met principalement en jeu les cellules granulaires du GD et les cellules pyramidales des champs CA3 et CA1. Ces cellules sont excitatrices et comme dit précédemment elles utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Les fibres de la voie perforante issues du cortex entorhinal pénètrent dans l'hippocampe et contactent les cellules granulaires du GD. Les axones des cellules granulaires forment les fibres moussues et projettent vers les dendrites apicales des cellules pyramidales de la portion proximale du CA3 formant ainsi une synapse excitatrice (Blackstad, 1956; Swanson et al., 1978). Les axones des neurones pyramidaux de CA3 sont à l'origine des *collatérales de Schaffer*. Ces collatérales se terminent au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 et plus précisément sur les dendrites apicales du *stratum moleculare/lacunosum*.

I.1.5. Les connexions efférentes de l'hippocampe

L'hippocampe fait partie des structures constituant le circuit de Papez appelé aussi circuit hippocampo-mamillo-thalamique. Ce circuit est particulièrement impliqué dans la mémoire. La principale voie de sortie de l'hippocampe a comme point de départ le fornix. Celui-ci permet d'envoyer les informations de l'hippocampe vers les corps mamilaires puis le noyau antérieur du thalamus en passant par le tractus mamillo-thalamique. L'information nerveuse rejoint ensuite le cortex cingulaire via la capsule interne, puis le cortex entorhinal grâce au cingulum avant de retourner vers l'hippocampe. Le fornix permet aussi d'envoyer des informations nerveuses vers l'hypothalamus, le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire préoptique et le tronc cérébral. L'autre voie de sortie de l'hippocampe passe par le subiculum situé entre l'aire CA1 et le cortex entorhinal. Ce dernier projette ses fibres vers différentes aires associatives du cortex cérébral comme la circonvolution parahippocampique, les cortex cingulaire, préfrontal et orbitofrontal (Vann and Nelson, 2015).

II. Transmission synaptique dans le réseau hippocampique

Comme déjà mentionné, au sein de l'hippocampe, la transmission synaptique excitatrice est assurée principalement par le glutamate, alors que les transmissions inhibitrices sont assurées par le GABA (acide γ -aminobutyrique). Les effets de ces deux systèmes de neurotransmission au sein de l'hippocampe seront décrits dans ce chapitre.

II.1. La transmission glutamatergique

Depuis les premières études de Curtis et de ses collaborateurs en 1961, il est bien connu que le glutamate a un effet dépolarisant (Curtis et al., 1961; Curtis and Watkins, 1961). Aujourd'hui, le glutamate est reconnu comme le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Les effets du glutamate s'expriment au travers de la mise en jeu de deux familles de récepteurs : *i*) des récepteurs ionotropiques (iGluR) qui sont des récepteurs-canaux ligand-dépendant et *ii*) des récepteurs métabotropiques (mGluR) qui sont couplés à une protéine G. Dans ce chapitre, ces deux types de récepteurs seront décrits ainsi que leurs effets cellulaires.

II.1.1. Les récepteurs ionotropiques au glutamate

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques, chacun dénommé suivant son agoniste le plus sélectif : *i*) le récepteur AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate), *ii*) le récepteur Kainate, sensible à l'acide kainique et *iii*) le récepteur NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate). Les récepteurs AMPA et kainate sont aussi appelés récepteurs non-NMDA (Collingridge et al., 2009). Les récepteurs ionotropiques au glutamate possèdent une structure moléculaire similaire constituées de quatre domaines *i*) un domaine C-terminal intracellulaire impliqué dans l'adressage du récepteur au niveau synaptique *ii*) un domaine N-terminal extracellulaire *iii*) un domaine de liaison du ligand associé à *iv*) un domaine transmembranaire formant le canal. Les 3 types de récepteurs participent à la transmission glutamatergique rapide (Traynelis et al., 2010).

Le récepteur AMPA

Le récepteur AMPA est une glycoprotéine. En utilisant le clonage moléculaire, 4 sous-unités ont été identifiées et dénommées GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Chaque sous-unité est une séquence polypeptidique de 900 acides aminés environ. Ces sous-unités sont hautement exprimées dans le système nerveux central. Chez les mammifères, *in vivo*, le récepteur AMPA est formé de différentes combinaisons des 4 types de sous-unités d'où une grande diversité de récepteur. Cette diversité est encore amplifiée par les mécanismes d'épissage alternatif et d'édition des ARN messager (ARNm). L'épissage alternatif concerne la région C-terminale du domaine transmembranaire M4 de toutes les sous-unités. En revanche, l'édition ne concerne que la sous-unité GluA2 qui possède un acide aminé arginine dans le domaine transmembranaire M2 en position 586. Le codon CGC de l'arginine est introduit dans le pré-ARNm grâce au mécanisme d'édition effectué par l'enzyme adénosine déaminase 2. En période post-natale, 99% des sous-unités GluA2 sont éditées (Chater and Goda, 2014). De manière importante, les récepteurs AMPA sont perméables aux cations monovalents et imperméables aux cations divalents, notamment au calcium. Or, cette imperméabilité au calcium dépend de la présence de la sous-unité GluA2 dans le récepteur AMPA. En effet, à l'aide du modèle expérimental d'ovocyte de xénope, dans lequel on exprime le récepteur dont on souhaite étudier les propriétés, il a été montré que le canal oligomérique formé de la sous-unité GluA2 et GluA1 est imperméable au Ca^{2+} (Bredt and Nicoll, 2003). En ce qui concerne les cellules pyramidales de l'hippocampe les récepteurs canaux AMPA ne sont que très peu perméables au Ca^{2+} . En présence de glutamate, leur activation génère un courant entrant dû à un fort influx de sodium (Na^+), accompagnée d'une légère entrée de Ca^{2+} (dépendant de la présence de la sous-unité GluA2) et d'une légère sortie de K^+ . L'ensemble de ces mouvements de cations dépolarise la cellule pyramidale (Kullmann, 1999; Turrigiano, 2000).

Le récepteur Kaïnate

La famille des récepteurs kaïnate est composée de cinq sous-unités (GluK1 à GluK5) codés par cinq gènes différents. Des études d'hybridation *in situ* ont montré que les cinq types de sous-unités sont exprimées dans l'hippocampe de rat et de souris (Bureau et al., 1999; Wisden and Seeburg, 1993). Le récepteur kaïnate est un complexe tétramérique composé d'une combinaison des cinq sous-unités. Comme les récepteurs AMPA, les ARNm des sous-

unités du récepteur kaïnate subissent des modifications par épissage alternatif et par édition. Cette édition concerne les ARNm des sous-unités GluK1 et GluK2 en changeant l'acide aminé glutamine du domaine transmembranaire M2 en arginine rendant ainsi ces sous-unités très peu perméables au Ca^{2+} . Chez l'adulte, les deux formes éditées et non éditées coexistent (Carta et al., 2014; Lerma, 2003). Les récepteurs kaïnates sont perméables aux cations monovalents générant un courant entrant dépolarisant.

Le récepteur NMDA

Le clonage moléculaire a permis d'identifier 7 sous-unités du récepteur NMDA (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A et GluN3B) classées en trois familles (GluN1, GluN2 et GluN3). La famille GluN1 est codée par le gène *Grin1*. Après épissage alternatif, 8 isoformes sont générés (GluN1-1a -> GluN1-4a ; GluN1-1b -> GluN1-4b). La famille GluN2 ne contient que 4 membres issus de 4 gènes différents (*Grin2a* -> *Grin2d* chez le rat). Enfin les membres de la famille GluN3 sont codés par 2 gènes différents (*Grin3a* et *Grin3b*). Cette dernière famille est la moins caractérisée, ainsi sa présence et son rôle dans le récepteur NMDA sont mal connus. Le récepteur NMDA fonctionnel est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités obligatoires GluN1 associées à 2 sous-unités de type GluN2. Les hétérodimères GluN1/GluN2B et GluN1/GluN2A représentent les fractions les plus importantes dans le SNC de l'animal juvénile et adulte, respectivement. L'hétérotrimère GluN1/GluN2A/GluN2B a été également identifié dans différentes régions du cerveau et particulièrement au sein de l'hippocampe et du cortex. Un complexe tri-hétérodimérique peut être aussi formé à partir de 2 sous-unités GluN1 associées à une sous-unité GluN2 et une sous-unité GluN3 (Banerjee et al., 2016; Iacobucci and Popescu, 2017; Naassila and Pierrefiche, 2018; Paoletti et al., 2013; Papouin and Oliet, 2014; Qiu et al., 2011). Sur le plan fonctionnel, la sous-unité GluN1 contient le site de fixation des co-agonistes endogènes (la glycine et la D-sérine), tandis que la sous-unité GluN2 possède le site de liaison au glutamate et donc aux antagonistes compétitifs (figure 5). Au niveau de l'hippocampe, les sous-unités GluN2 les plus répandues sont GluN2A et GluN2B. les sous-unités GluN2C et GluN2D sont présentes principalement pendant le développement et leurs niveaux d'expression diminuent fortement chez l'adulte (Monyer et al., 1994). Le niveau d'expression de GluN2B est très élevé à la naissance et diminue à l'âge

adulte. A l'inverse, la quantité de sous-unité GluN2A augmente avec l'âge (Dumas, 2005; Monyer et al., 1994; Yashiro and Philpot, 2008). En plus de l'impact de l'âge sur le niveau d'expression des sous-unités, leur localisation anatomique peut aussi affecter leur expression. En effet, le niveau d'expression de la sous-unité GluN2B peut être différent dans la synapse CA3-CA1 en fonction de l'hémisphère gauche ou droit (Shinohara et al., 2008). La composition en sous-unité du récepteur NMDA peut aussi varier en fonction de la localisation au niveau de la membrane cellulaire. Typiquement, le récepteur NMDA est localisé en position post-synaptique. Une faible proportion des récepteurs NMDA existe en position pré-synaptique et leur rôle est mal connu. Chez l'adulte, le récepteur NMDA synaptique est un hétérodimère composé des sous-unités GluN1/GluN2A ou un hétérotrimère composé des sous-unités GluN1/GluN2A/GluN2B. En revanche, au niveau des sites péri et extra-synaptiques, le récepteur NMDA est richement formé de la sous-unité GluN2B (Gladding and Raymond, 2011; Hardingham and Bading, 2010). L'interaction des sous-unités GluN2A et GluN2B avec les protéines MAGUK (membrane associated guanylate kinases), comme SAP102, SAP97, PSD90 et PSD95, assure la stabilisation du récepteur NMDA au niveau membranaire (O'Brien et al., 1998). De manière intéressante, le récepteur NMDA contenant la sous-unité GluN2B est capable d'une mobilité latérale au niveau membranaire qui lui permet de diffuser à partir du site extra-synaptique vers le site synaptique et vice-versa. Ce processus participe à la régulation du nombre de récepteurs NMDA au niveau de la synapse ainsi que sa composition en sous-unités (Groc et al., 2006; Tovar and Westbrook, 2002). Le récepteur NMDA est un canal ligand-dépendant perméable aux cations et particulièrement au Ca^{2+} . Cependant, un ion Mg^{2+} bloque le canal au potentiel de repos, rendant le récepteur NMDA très dépendant de la valeur du potentiel de membrane (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Une fois activé, la conductance du récepteur NMDA dépend de la composition en sous-unité (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Paoletti et al., 2013; Traynelis et al., 2010). En effet, l'hétérodimère contenant la sous-unité GluN2A ou GluN2B présente une forte conductance de l'ordre de 50pS contrairement aux hétérodimères qui contiennent la sous-unité GluN2C ou GluN2D qui ont une plus faible conductance (37pS environ). Plus encore, les propriétés biophysiques du récepteur NMDA dépendent de l'identité de la sous-unité GluN2 qu'il contient. En présence de glutamate, le complexe GluN1/GluN2A a une plus grande probabilité d'ouverture comparé aux complexes GluN1/GluN2B. De plus, la cinétique d'inactivation du courant post-synaptique excitateur (CPSE) est aussi déterminée par la composition en sous-unité du récepteur NMDA.

L'hétérodimère GluN1/GluN2A génère un courant à inactivation très rapide par rapport au complexe GluN1/GluN2B alors que l'hétérodimère GluN1/GluN2D possède le temps d'inactivation le plus lent (figure 5). Le récepteur NMDA contient également plusieurs sites de fixation de modulateurs allostériques endogènes et exogènes (figure 5). Parmi ces modulateurs, nous citerons le zinc (Zn^{2+}). Les sous-unités GluN2A et GluN2B sont toutes les deux sensibles au Zn^{2+} , en revanche l'affinité de la sous-unité GluN2A pour le Zn^{2+} est supérieure à celle de GluN2B. De ce fait, une faible concentration de Zn^{2+} ($<1\mu M$) bloque préférentiellement le complexe GluN1/GluN2A et moins le complexe GluN1/GluN2B (Nozaki et al., 2011; Paoletti et al., 1997; Rachline et al., 2005). De nombreux antagonistes pharmacologiques ont été utilisés afin de déterminer le rôle des sous-unités qui composent le récepteur NMDA, par exemple le NVP-AAM077 qui est utilisé à très faible concentration (Shipton and Paulsen, 2014) afin de bloquer sélectivement la sous-unité GluN2A. Concernant la sous-unité GluN2B, l'ifenprodil et son dérivé le RO 25-6981 sont connus pour agir sur l'interface entre la sous-unité GluN1 et GluN2B bloquant ainsi le pore du canal (Karakas et al., 2011; Paoletti et al., 2013; Papouin et al., 2012).

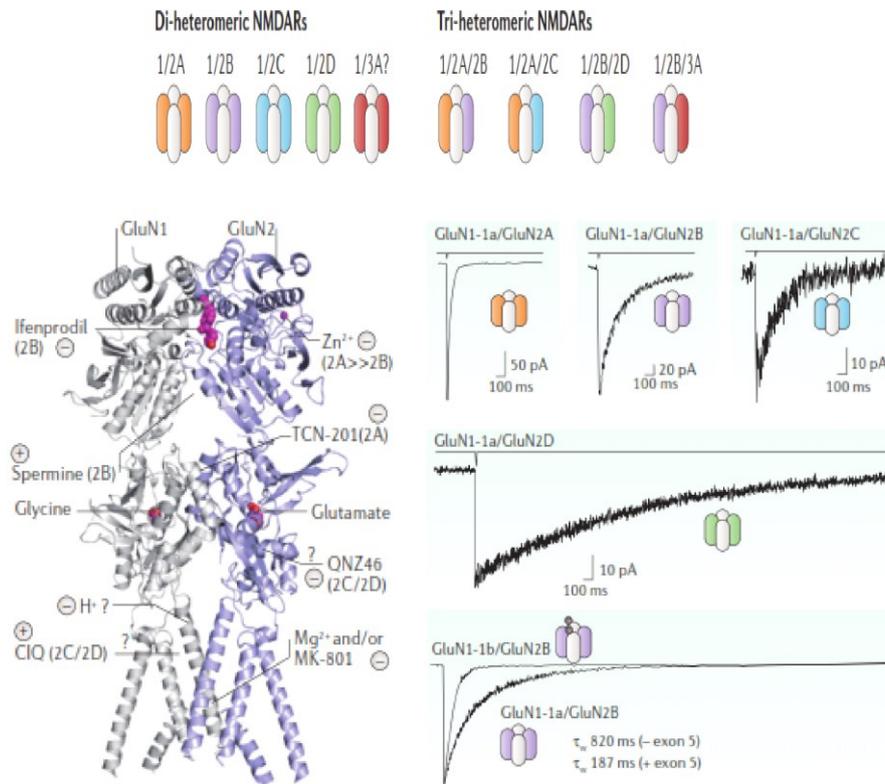


Figure 5: Le récepteur NMDA : diversité des sous-unités, structure et propriétés. **En haut**, les différentes sous-unités ainsi que les possibles combinaisons formant le récepteur NMDA. **En bas à gauche**, modèle de la structure du récepteur NMDA formé par les sous-unités GluN1 et GluN2 et les sites de liaison des modulateurs allostériques positifs et négatifs. **En bas à droite**, l'influence de la composition des sous-unités sur la cinétique d'inactivation du courant médié par le récepteur NMDA. Le complexe hétérodimérique contenant la sous-unité GluN2A possède la cinétique d'inactivation la plus rapide. (Adapté d'après Paoletti et al., 2013).

II.1.2. Les récepteurs métabotropiques au glutamate

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) sont des protéines à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Huit sous-types de mGluR ont été clonés (mGluR1 à mGluR8) et classés en trois groupes en fonction de leurs homologies de séquence polypeptidique et du second messager impliqué (Pin and Duvoisin, 1995). Ainsi, les récepteurs mGluR1 et mGluR5 forment le groupe I ; le groupe II est constitué des récepteurs mGluR2 et mGluR3 et enfin le groupe III contient les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Après épissage alternatif, plusieurs variants sont générés : 3 variants du récepteur mGluR1, 2 variants du récepteur mGluR5 et 2 variants du récepteur mGluR7 (Minakami et al., 1993; Pin et al., 1992). Les extrémités intracellulaires de ces variants sont différentes ce qui leur confère des interactions spécifiques avec les protéines intracellulaires responsables de la régulation de leur adressage au niveau membranaire. Au sein de l'hippocampe, des études en immunomarquage ont montré que les récepteurs métabotropiques du groupe I sont localisés au niveau de la membrane post-synaptique et plus précisément en péri-synaptique. Le récepteur mGluR1 est présent sur les neurones pyramidaux de l'aire CA3 mais pas sur ceux de l'aire CA1 alors que le récepteur mGluR5 est fortement exprimé sur les neurones pyramidaux du *stratum oriens* et *pyramidale* au niveau du CA1 (Lujan et al., 1996; Masu et al., 1991). Les mGluRs du groupe I sont couplés à la voie de la phospholipase C (PLC) par le biais d'une protéine $G\alpha_q$. Cette voie de signalisation induit une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et active la protéine kinase C (PKC). L'activation de ces récepteurs permet de potentialiser la réponse induite par les récepteurs ionotropiques au glutamate mais aussi d'augmenter l'excitabilité neuronale en modulant l'activité de conductances calciques et potassiques (Anwyl, 1999). Les mGluRs du groupe II sont localisés à la fois en position pré- et post-synaptique au sein de plusieurs structures cérébrales. Dans l'hippocampe, les récepteurs mGluR2 et mGluR3 sont présents dans la voie perforante et les fibres myélinisées. En plus des neurones, le récepteur mGluR3 est exprimé dans les cellules gliales et particulièrement les cellules astrocytaires activées (Ohishi et al., 1993; Petralia et al., 1996; Shigemoto et al., 1997; Tanabe et al., 1992). Ces récepteurs sont couplés à la protéine G_i/G_o associée à la voie de l'adénylate cyclase qui permet l'accumulation d'AMPc dans le milieu intracellulaire. Les récepteurs mGluR2 et mGluR3, une fois activés, jouent le rôle d'autorécepteur permettant

d'inhiber la libération de neurotransmetteur. Les récepteurs métabotropiques au glutamate du groupe III sont aussi localisés en position présynaptique mais uniquement dans la zone active de la synapse, excepté le mGluR6 qui a été identifié en position postsynaptique au niveau rétinien (Ferraguti and Shigemoto, 2006; Shigemoto et al., 1997). Comme les récepteurs du groupe II, les mGluRs du groupe III sont couplés à la voie de l'adénylate cyclase et leur activation induit une inhibition de la libération vésiculaire.

II.1.3. La transmission GABAergique

Le GABA représente le principal neurotransmetteur inhibiteur au sein du système nerveux central (Krnjević and Schwartz, 1967). Il agit sur trois types de récepteurs postsynaptiques : Les récepteurs ionotropiques GABA_A, GABA_C et le récepteur métabotrope GABA_B. Seuls les récepteurs A et B, les plus connus, seront succinctement présentés dans ce chapitre.

Le récepteur GABA_A

Le récepteur GABA_A est un complexe hétéropentamérique appartenant à la famille des récepteurs canaux ligand dépendant (Barnard et al., 1987; Collingridge et al., 2009). Plusieurs sous-unités ont été identifiées par clonage moléculaire : 6 sous-unités α (de $\alpha 1$ à $\alpha 6$), 3 sous-unités β (de $\beta 1$ à $\beta 3$), 3 sous-unités γ (de $\gamma 1$ à $\gamma 3$), une sous-unité δ , une sous unité θ , une sous-unité π et 3 sous-unités ρ (de $\rho 1$ à $\rho 3$) (Olsen, 2018). Le récepteur GABA_A natif est constitué de deux sous-unités α , deux sous-unités β et d'une supplémentaire, comme par exemple une sous-unité γ . Au regard de cette diversité de sous-unités, plusieurs combinaisons sont possibles. La combinaison la plus abondante dans le cerveau mature est $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. Ce récepteur est fortement exprimé dans les interneurons de l'hippocampe (McKernan and Whiting, 1996). Dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, c'est le complexe $\alpha 5\beta 3\gamma 2/\gamma 3$ qui est exprimé. Les récepteurs GABA_A possèdent deux sites de fixation au GABA situés sur le domaine extracellulaire du récepteur à l'interface entre les sous-unités α et β (Amin and Weiss, 1993; Smith and Olsen, 1994). Ces récepteurs possèdent aussi plusieurs autres sites de

fixations de modulateurs allostériques positifs et négatifs tels que les benzodiazépines, les barbituriques, les stéroïdes, la picrotoxine et le zinc. En présence de GABA, le canal GABA_A est principalement perméable au chlore (Cl⁻) mais il peut aussi être perméable à d'autres anions comme les ions bicarbonate (HCO³⁻). Les anions une fois dans le milieu intracellulaire hyperpolarisent le potentiel de la membrane neuronale et induisent une inhibition rapide de l'activité de la cellule.

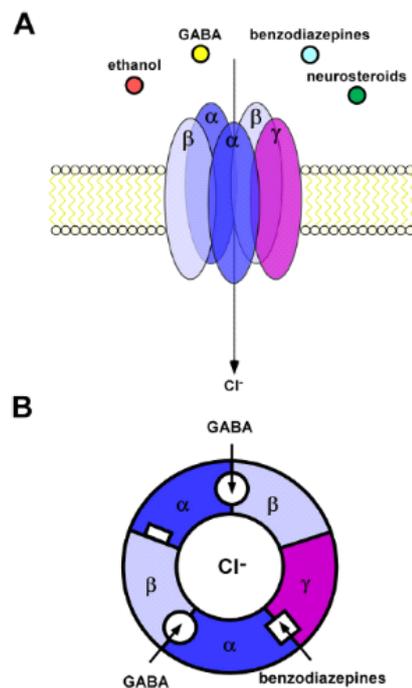


Figure 6: La structure du récepteur GABA_A. **A)** représentation schématique du récepteur GABA_A. Parmi les 19 sous-unités qui peuvent le composer, les récepteurs sont majoritairement composés de deux sous-unités α , deux sous-unités β et une sous-unité γ . Ce récepteur possède différents sites de modulateurs allostériques comme l'éthanol, les benzodiazépines et les neurostéroïdes. **B)** le GABA a deux sites de fixation au niveau du récepteur GABA_A situés dans l'interface entre la sous-unité α et la sous-unité β . Le site de fixation des benzodiazépines est localisé dans l'interface entre la sous-unité α et la sous-unité γ . (Gravielle, 2018)

Le récepteur GABA_B

Contrairement aux récepteurs GABA_A, les récepteurs GABA_B sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G_i/G_o. Deux sous-unités (GABA_{B1} et GABA_{B2}), issues de deux gènes différents, forment le récepteur GABA_B fonctionnel. Ce récepteur est localisé en position post-synaptique. L'activation de ce récepteur est responsable de la composante tardive du potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI) via l'inhibition de canaux Ca²⁺ voltage dépendants et l'activation des canaux potassiques de types GIRK (G-protein-coupled-inwardly rectifying K⁺ channel) (Frangaj and Fan, 2017; Sivilotti and Nistri, 1991).

III. La plasticité synaptique

De manière intéressante, il a été observé que les neurones du système nerveux central possèdent une capacité d'adaptation aux modifications concernant leur environnement. Cette caractéristique est appelée plasticité (Grossman et al., 2002). Le phénomène de plasticité survient à plusieurs échelles allant des modifications moléculaires au niveau de la synapse jusqu'au remodelage des circuits neuronaux. La plasticité synaptique, sur le plan fonctionnel, est plus précisément, la capacité de la synapse à remodeler son équipement membranaire afin de moduler son efficacité de transmission en fonction de l'activité du réseau ou de l'action de certains neurotransmetteurs. Ces changements peuvent être *i)* à court terme, on parle alors de plasticité à court terme, d'une durée allant de quelques millisecondes à quelques minutes et qui est responsable de processus d'adaptation rapide ou *ii)* à long terme, on parle alors de plasticité à long terme, d'une durée allant de 30 min à plusieurs semaines. Aujourd'hui, cette seconde forme de plasticité est considérée comme le principal mécanisme cellulaire sous-tendant la fonction de mémorisation en représentant une forme de stockage neuronale de l'information.

III.1. La plasticité synaptique à court terme

La plasticité à court terme ne dure que quelques minutes et peut être de différents types : par exemple une facilitation ou une dépression transitoire ou encore une potentialisation post-tétanique. Le phénomène de facilitation transitoire peut être induit électriquement par deux stimulations suffisamment rapprochées dans le temps, appelées « *paired pulse* », et pour lesquelles la deuxième réponse peut être jusqu'à cinq fois plus importante que la première (Zucker and Regehr, 2002). Ce phénomène est médié par des modifications pré-synaptique associées à des fluctuations de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Katz and Miledi, n.d.; Korpi et al., 2015; Zucker and Regehr, 2002). Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous n'avons étudié que la facilitation transitoire à court terme. Celle-ci est due à une augmentation de l'activité des canaux calciques présynaptiques. En effet suite à la première stimulation, le Ca^{2+} s'accumule dans le milieu intracellulaire augmentant ainsi la probabilité de libération vésiculaire lors de la seconde stimulation (figure 7). En revanche, une forte stimulation électrique plus fréquente peut induire une déplétion vésiculaire dans l'élément pré-synaptique ce qui, par conséquent, conduit à une dépression à court-terme (figure 7) (Neher and Sakaba, 2008).

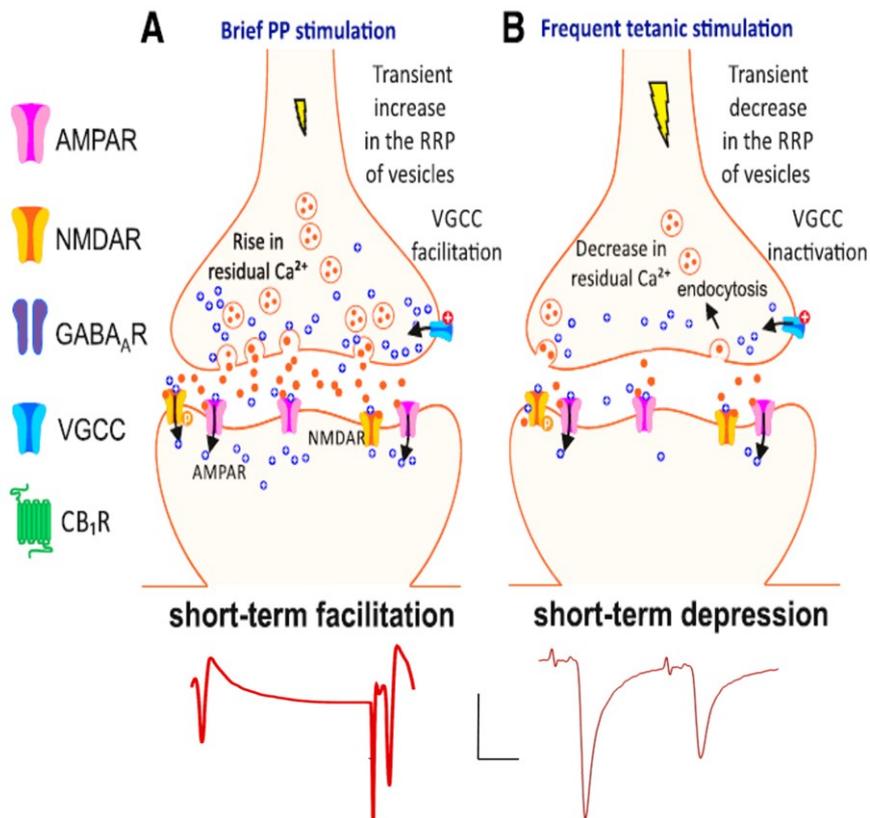


Figure 7: Les protocoles d'induction de la facilitation et de la dépression à court terme. **A)** une paire de stimulation rapide induit une facilitation à court-terme en augmentant d'une manière transitoire la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans le neurone présynaptique. En bas, un exemple de tracé montrant la réponse synaptique pendant l'application d'un protocole de facilitation synaptique. La réponse induite par la seconde stimulation est plus importante que celle induite par la première stimulation. **B)** La dépression à court terme de la transmission synaptique peut être induite par une répétition d'une stimulation tétanique, ce qui conduit à une déplétion transitoire des vésicules synaptiques. En bas, un exemple de tracé montrant la réponse synaptique pendant l'application d'un protocole de dépression à court terme. La réponse induite par la seconde stimulation est plus faible que celle induite par la première (Adaptée d'après Korpi et., 2015). Barre d'échelle : barre verticale correspond à 1mV, barre horizontale correspond à 10 ms.

III.2. La plasticité synaptique à long terme

Une des formes de plasticité à long terme correspond au renforcement du poids synaptique que l'on appelle potentialisation à long terme (PLT) et une autre forme correspond, à l'inverse, à la diminution de l'efficacité de la synapse appelé dépression à long terme (DLT). Ces deux formes de plasticité sont souvent observables, expérimentalement, sur une même synapse et l'on parle alors de plasticité bidirectionnelle. La plasticité à long terme a été étudiée au niveau de différentes structures cérébrales comme par exemple l'hippocampe, le cortex et le striatum. Au niveau de l'hippocampe, PLT et DLT ont été étudiées dans les synapses glutamatergiques entre les cellules pyramidales mais aussi dans les synapses GABAergiques entre les interneurons et les cellules pyramidales (O. Caillard et al., 1999; Olivier Caillard et al., 1999). Sur le plan des mécanismes cellulaires d'induction, la plasticité synaptique à long terme qui dépend de la mise en jeu du récepteur NMDA post-synaptique est la forme la plus étudiée. Néanmoins, d'autres formes ont été découvertes comme la plasticité dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate ou des récepteurs aux endocannabinoïdes. Expérimentalement, le choix du protocole électrique d'induction de la plasticité synaptique est primordial afin d'induire la forme de plasticité souhaitée (dépendante soit des NMDARs, mGluRs ou eCB...). Avec les progrès de la recherche en neuroscience, il devient donc important de mentionner le type de synapse étudiée, l'âge auquel la plasticité synaptique a été examinée et le mode de déclenchement expérimental de la plasticité utilisé. Dans le cadre de mes travaux de thèse, je me suis intéressée exclusivement à la plasticité synaptique entre les cellules pyramidales de l'hippocampe, dépendante du récepteur NMDA.

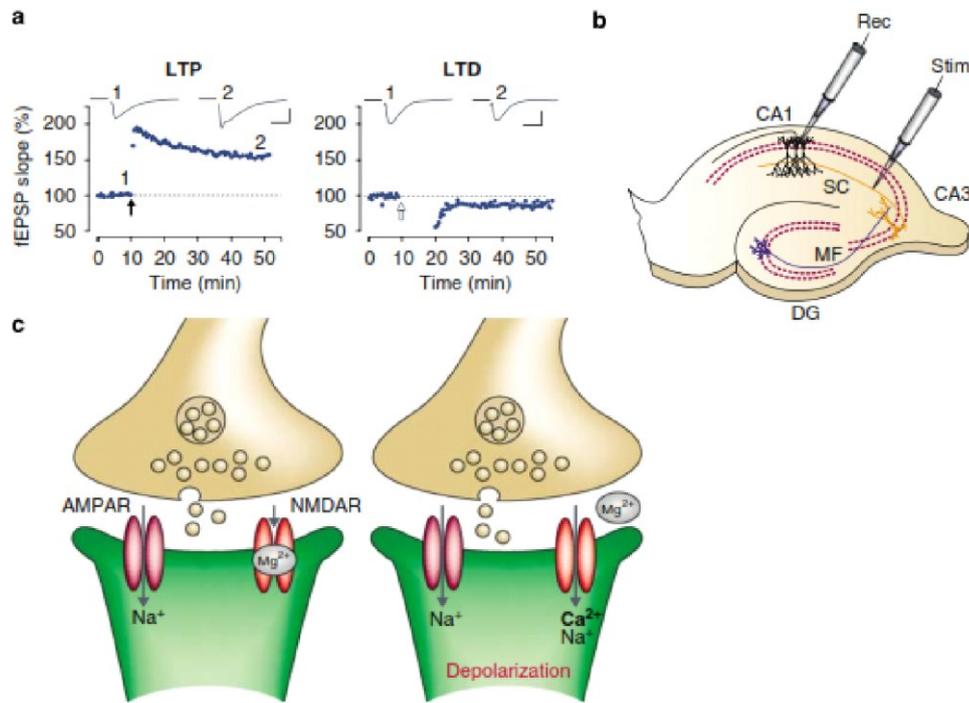


Figure 8: La PLT et la DLT dépendantes du récepteur NMDA dans la synapse CA3-CA1. **a)** Une illustration de la PLT et la DLT dans la région CA1 de l'hippocampe. Le poids de la synapse est défini comme étant la pente du PPSE de champs (fEPSP slope) en fonction du temps. A gauche, un enregistrement de PLT induite par une stimulation à haute fréquence (100Hz). A droite un enregistrement de DLT induite par une stimulation à basse fréquence (2 stimulations à 5Hz pendant 3min séparées de 3min d'intervalle). **b)** une représentation schématique de la tranche d'hippocampe de rongeur ainsi que l'emplacement des électrodes permettant l'enregistrement de la plasticité synaptique dans la synapse CA3-CA1. Une électrode de stimulation est placée au niveau des collatérales de Schaffer et une électrode d'enregistrement dans la région CA1. **c)** un modèle de transmission synaptique glutamatergique. **A gauche,** une transmission synaptique à l'état basal pendant laquelle le glutamate libéré par l'élément pré-synaptique se lie aux récepteurs AMPA et NMDA. L'activation des récepteurs AMPA permet l'entrée des ions Na⁺. Les récepteurs NMDA étant bloqués par l'ion Mg²⁺ ne permettent pas le passage des ions. **A droite,** la dépolarisation de l'élément post-synaptique enlève le bouchon Mg²⁺, d'où l'entrée des ions Na⁺ et Ca²⁺ à travers le récepteur NMDA. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire est indispensable pour la plasticité synaptique. (Citri and Malenka, 2008).

III.2.1. La potentialisation à long terme

III.2.1.1. La potentialisation à long terme dépendante du récepteur NMDA

La PLT, forme de plasticité synaptique la plus étudiée, a été observée pour la première fois par Bliss et Lomo en 1973 suite à l'application d'une stimulation tétanique au niveau de la voie perforante de l'hippocampe chez un lapin anesthésié. Cette stimulation a induit une augmentation durable de l'amplitude de la réponse post-synaptique et une diminution de la latence d'apparition du potentiel de champ (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Lomo, 1973). Ces changements de la transmission synaptique durent de quelques heures, *in vitro et in vivo*, à quelques semaines *in vivo* et caractérisent donc la potentialisation à long terme. Avec le développement du modèle expérimental de tranche aigue d'hippocampe, il est devenu aisé d'expérimenter et d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires de la PLT. En effet, de très nombreuses expériences ont permis de déchiffrer les mécanismes moléculaires de la PLT au niveau, principalement des synapses de la voie perforante et du GD ainsi qu'au niveau de la synapse CA3-CA1. Les conclusions tirées des études sur l'hippocampe ont été généralement appliquée à d'autres structures cérébrales comme le cortex.

Induction de la PLT dépendante du récepteur NMDA

Il a été bien établi qu'il existe dans l'aire CA1, une forme de PLT dont l'induction nécessite l'activation des récepteurs NMDA post-synaptiques. En effet, la PLT induite peut être bloquée en présence d'un antagoniste NMDA. La mise en jeu du récepteur NMDA est due à la forte dépolarisation du neurone pyramidal, qui permet d'évacuer l'ion Mg^{2+} bloquant le récepteur NMDA. Ce dernier devenant ainsi perméable au Ca^{2+} , la concentration du Ca^{2+} augmente dans le milieu intracellulaire ce qui active des processus biochimiques nécessaires pour le maintien de la PLT dans le temps (Malenka, 1991; Malenka and Nicoll, 1993). Expérimentalement, il est possible d'induire une PLT en appliquant simplement du NMDA, on parle alors d'une induction chimique ou en utilisant une stimulation électrique à haute fréquence dans l'élément pré-synaptique. Communément, des stimulations tétaniques de 50 à 100Hz sont utilisées (généralement appelées *High frequency stimulation, HFS*). Cette PLT

induite par la seule activité de la synapse est qualifiée de PLT homosynaptique. Un autre protocole appelé « *spike-time dependent plasticity (STDP)* » peut aussi induire une PLT, dite associative, reposant sur l'hypothèse de Hebb émise en 1949. Cette forme de PLT dépend de la relation temporelle entre l'activité pré-synaptique et l'activité post-synaptique. Le protocole d'induction consiste en un couplage entre une activation pré-synaptique (potentiel post-synaptique exciteur, PPSE) avec l'injection d'un courant post-synaptique dépolarisant et générant un train d'une dizaine de potentiels d'action (activité post-synaptique). Cette corrélation positive entre activité pré-synaptique et activité post-synaptique induit une potentialisation. L'amplitude de la potentialisation dépend du délai Δt entre PPSE et activité post-synaptique de telle sorte que plus le délai est court et plus la potentialisation est importante (Dan and Poo, 2006; Markram et al., 1997).

Le mécanisme de transduction du signal calcique en PLT

Un grand nombre de molécules a été suggéré comme jouant un rôle dans la traduction du signal calcique intracellulaire en PLT. Plusieurs études ont montré que la protéine kinase II dépendante du complexe Calcium/Calmoduline (CaMKII) est nécessaire pour la PLT. En effet, la PLT est absente chez les animaux déficients pour le gène codant pour la CaMKII (Silva et al., 1992) mais aussi en présence de son inhibiteur spécifique appliqué dans l'élément post-synaptique (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989). L'activation de la CaMKII induit la formation d'AMP cyclique (AMPC) à partir de l'ATP via l'adénylate cyclase activant ainsi la protéine kinase A (PKA) (Huang and Kandel, 1994). Cette kinase renforce l'activité de la CaMKII en inhibant, via *inhibitor 1*, l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1) augmentant ainsi l'autophosphorylation de CaMKII au niveau de l'acide aminé thréonine en position 286 (Blitzer et al., 1998; Lisman, 1989; Makhinson et al., 1999). Ce processus d'autophosphorylation permet à la protéine CaMKII de rester activée après l'induction de la PLT. (Fukunaga et al., 1993; Ouyang et al., 1997). D'autres facteurs importants ont été identifiés pour l'induction de la PLT. C'est le cas de la voie *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* et *extracellular signal-regulated kinase (ERK)* (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). Le rôle de la voie de la MAPK dans l'induction de la PLT dans l'aire CA1 a été mis en évidence par la suppression de la PLT en présence d'inhibiteur spécifique de la MAPK (English and Sweatt, 1997). Dans

l'hippocampe, l'AMPC active le récepteur à la protéine kinase B (TrkB) qui, à son tour, active ERK. (Impey et al., 1998; Patterson et al., 2001). La protéine kinase Src est aussi impliquée dans la PLT en permettant d'augmenter l'activité du récepteur NMDA pendant l'induction de la PLT (Salter and Kalia, 2004). Enfin la protéine Kinase C (PKC) et son isozyme PKM ζ semblent aussi jouer un rôle dans la PLT puisque l'expression de PKM ζ augmente rapidement pendant l'induction de la PLT mais aussi pendant les phases tardive du maintien de la potentialisation (Citri and Malenka, 2008; Hrabetova and Sacktor, 1996).

Le mécanisme d'expression de la PLT

Le mécanisme majeur de l'expression de la PLT fait intervenir les récepteurs AMPA post-synaptiques. L'activation des protéines kinases citées précédemment conduit, en premier lieu, à la phosphorylation des récepteurs AMPA présents dans la membrane post-synaptique afin d'augmenter leur activité. C'est la CaMKII qui phosphoryle directement la sous-unité GluR1 au niveau de la sérine 831, ce qui augmente la conductance du récepteur AMPA (Barria et al., 1997b, 1997a; Benke et al., 1998). La phosphorylation de GluR1 permet aussi l'interaction de cette sous-unité avec les protéines synaptiques, comme SAP97 ou PSD97, très probablement via le domaine PDZ de l'extrémité C-terminale de la sous-unité GluR1, ce qui permet l'ancrage de nouveaux récepteurs AMPA dans la membrane de l'épine dendritique. (Hayashi et al., 2000; Shi et al., 2001). Une autre phosphorylation, celle de la sérine 845 de la sous-unité GluR1 s'avère être également importante pour l'expression de la PLT. Les outils pharmacologiques et la mutagenèse de cet acide aminé montrent que sa phosphorylation est nécessaire pour l'expression de la PLT parce qu'elle permet l'insertion des récepteurs AMPA dans la membrane post-synaptique, au niveau extrasynaptique puis synaptique par diffusion latérale (Malinow, 2003; Man et al., 2007; Oh et al., 2006). Les récepteurs AMPA nouvellement ajoutés à la membrane sont issus d'une réserve contenue dans les endosomes de l'épine dendritique et mobilisée pendant la PLT via un processus dépendant de la protéine Rab11a (Park et al., 2004).

Le mécanisme de maintien de la PLT

Comme déjà mentionné, la plasticité synaptique à long terme peut durer jusqu'à des semaines. Plusieurs études se sont focalisées sur les premières trente minutes de PLT faute d'outils expérimentaux qui permettent de suivre la potentialisation pendant plusieurs jours, tout au moins *in vitro*. Il n'en demeure pas moins que certaines études se sont penchées sur la question de la persistance et du maintien de la PLT qui nécessitent finalement, la transcription de certains gènes au niveau nucléaire mais aussi la traduction d'ARNm au niveau des dendrites (Nguyen et al., 1994). La transcription des gènes est sous l'influence des protéines kinases (PKA, CaMKIV et Erk-MAP) qui sont responsables de l'activation des facteurs de transcription dépendant de l'AMPc et de c-Fos. Ainsi, l'activation de ces facteurs de transcription permet la synthèse de nouvelles protéines qui sont importantes pour maintenir la PLT (Citri and Malenka, 2008). Plusieurs études se sont intéressées au soma, néanmoins la traduction des ARNm au niveau dendritique semble être suffisante pour maintenir une potentialisation. Par exemple, la traduction de l'ARNm codant pour le facteur neurotrophique BDNF est suffisante pour conserver la potentialisation de la synapse CA3-CA1 alors que les dendrites des neurones pyramidaux de la région CA1 ont été séparées du soma (Kang and Schuman, 1996). D'autres ARNm ont été identifiés dans les dendrites comme ceux codants pour le récepteur AMPA et la protéine kinase CaMKII (Grooms et al., 2006; Job and Eberwine, 2001; Ju et al., 2004). Ceci suggère qu'une machinerie locale est disponible au niveau dendritique pour maintenir le renforcement synaptique après induction.

Un autre phénomène a été observé dans les dendrites et qui consiste en un changement de la forme et de la taille des épines dendritiques après induction de la PLT. C'est la plasticité structurale. Ces changements morphologiques incluent le développement de nouvelles épines dendritiques, la fragmentation d'une seule synapse en deux synapses fonctionnelles et l'élargissement des épines préexistantes dû à l'insertion de nouveaux récepteur AMPA et des lipides membranaires en post-synaptique (Lüscher et al., 2000; Matsuzaki et al., 2001; Yuste and Bonhoeffer, 2001). D'autre part, la membrane présynaptique subit un remodelage pendant la PLT avec un élargissement de la zone active de la synapse. Ces modifications présynaptiques nécessitent l'interaction de protéines pré et post-synaptiques comme les protéines d'adhésion de type cadhérine ou l'interaction neurologine/neuroxine (Lisman and Harris, 1993).

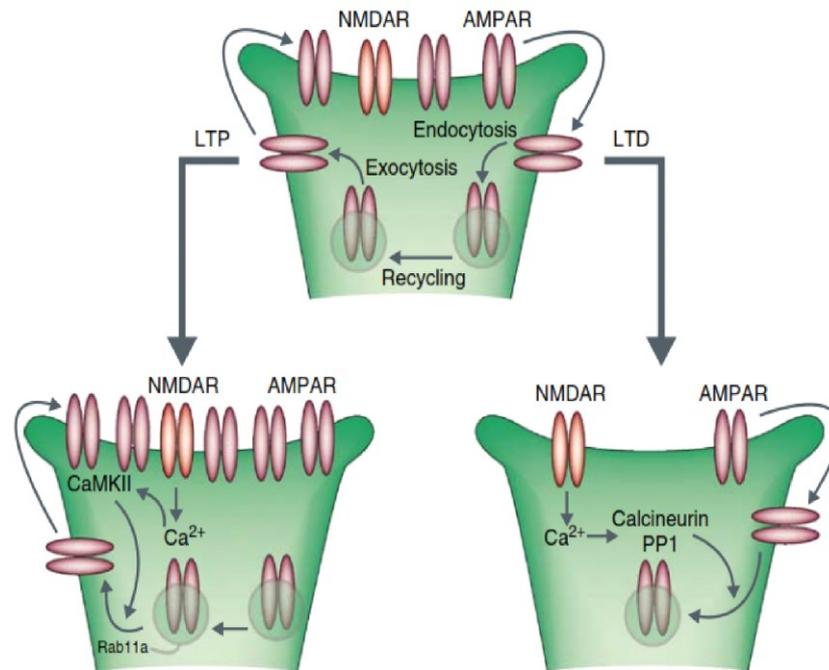


Figure 9: Le trafic du récepteur AMPA pendant la PLT et la DLT. **En haut**, le cycle de recyclage du récepteur AMPA dans le neurone post-synaptique en état basal. Le récepteur AMPA diffuse vers la zone d'endocytose en extra-synaptique où il est endocyté associé à un complexe clathérine. Le récepteur AMPA est ensuite transféré vers un endosome de recyclage puis intégré de nouveau à la membrane cellulaire par exocytose. **En bas à gauche**, l'induction de la PLT induit une élévation du nombre de récepteur AMPA via une augmentation de l'exocytose. Ce processus implique les protéines kinases CaMKII, dépendantes du Ca^{2+} et Rab11a. Les récepteurs AMPA sont d'abord exocytés au niveau extrasynaptique puis ils diffusent latéralement vers la zone active de la synapse où ils sont stabilisés par les protéines MAGUK. **En bas à droite**, l'induction de la DLT induit une augmentation de l'endocytose via un processus dépendant du Ca^{2+} et fait intervenir les phosphatases (calcineurine et PP1). Les récepteurs AMPA endocytés sont retenus dans la cellule ou dégradés (Citri and Malenka, 2008).

III.2.1.2. La potentialisation à long terme d'origine présynaptique

Une autre forme de PLT a été identifiée dans l'hippocampe. C'est la PLT présynaptique. Cette forme de plasticité a été fortement étudiée au niveau de la synapse entre les neurones granulaires du GD et les cellules pyramidales de l'aire CA3 de l'hippocampe. Néanmoins, elle a été observée dans d'autres régions cérébrales comme le thalamus et le cervelet (Korpi et al., 2015). La PLT d'origine présynaptique est induite expérimentalement, par un protocole de stimulation électrique à haute fréquence qui augmente la concentration de Ca^{2+} dans le neurone présynaptique. Le Ca^{2+} lié à la calmoduline permet la synthèse d'AMPC, l'activation de la PKA et la phosphorylation de substrats pré-synaptiques augmentant ainsi la libération vésiculaire (Nicoll and Malenka, 1995; Nicoll and Schmitz, 2005).

III.2.2. La plasticité à long terme de type dépression

La dépression à long terme (DLT) est un phénomène miroir de la PLT. Elle a été mise en évidence après la PLT et sa découverte a contribué à une meilleure compréhension de la fonction de la plasticité synaptique au sein des réseaux de neurones. En effet, en 1982 Bienenstock et ses collaborateurs ont proposé un modèle mathématique suggérant qu'un réseau de neurones ne peut pas se contenter d'exprimer la seule PLT car un tel réseau ne posséderait que des connexions dont le poids ne cesserait de croître jusqu'à arriver à saturation et donc, à terme, il deviendrait non-plastique (Bienenstock et al., 1982). La découverte de la DLT a donc permis de comprendre que les réseaux de neurones sont capables de conserver un potentiel de plasticité en diminuant le poids de la synapse à travers la DLT. De ce fait, PLT et DLT constituent ensemble le phénomène de plasticité synaptique, nommé dès lors, plasticité synaptique bidirectionnelle. Comme la PLT, la DLT peut être homosynaptique lorsqu'elle survient au niveau de la synapse qui reçoit le protocole d'induction ou bien, elle peut être hétérosynaptique lorsque la plasticité s'étend à des neurones qui sont en relation avec la synapse ayant reçue le protocole électrique (Collingridge et al., 2010). La DLT homosynaptique est divisée en trois types : la DLT dépendante *i)* du récepteur NMDA, *ii)* des récepteurs métabotropiques et *iii)* des récepteurs aux endocannabinoïdes. Notons cependant, que dans l'aire CA1 de rongeur adulte, la DLT

dépendante des récepteurs aux endocannabinoïdes ne concerne que les synapses inhibitrices (Chevalleyre and Castillo, 2004).

III.2.2.1. La dépression à long terme dépendante des récepteurs NMDA

La DLT dépendante du récepteur NMDA a été mise en évidence pour la première fois au niveau de la synapse CA3-CA1 (Dudek and Bear, 1992). Rapidement, cette forme de plasticité synaptique a été identifiée également dans le cortex visuel chez le chat juvénile et le rat adulte *in vitro* (Kirkwood et al., 1993). Il est maintenant clair que la DLT dépendante du récepteur NMDA est présente dans plusieurs structures cérébrales mais pour ce travail de doctorat nous nous sommes intéressés à la DLT dans l'aire CA1.

Le mécanisme d'induction de la DLT dépendante du récepteur NMDA

Dans l'aire CA1, la DLT homosynaptique dépendante du récepteur NMDA peut être induite expérimentalement par un protocole électrique à basse fréquence (dénommée LFS pour *low frequency stimulation*). Typiquement, le protocole utilisé est une stimulation électrique constitué d'un seul créneau de courant délivrée 600 ou 900 fois à une fréquence de 1Hz à 5Hz (LFS600 ou LFS900) (Dudek and Bear, 1992; Pierrefiche, 2017). La DLT ainsi induite peut être bloquée en présence d'un antagoniste des récepteurs NMDA. Cependant, le protocole d'induction de la DLT peut varier en fonction de l'âge. En effet, une étude réalisée sur des tranches d'hippocampe de rat a montré que le protocole électrique LFS900 était efficace chez les jeunes rats âgés de 12 à 40 jours mais pas chez les rats adultes âgés de 12 à 16 semaines (figure 10) (Kemp et al., 2000, p. 2). L'absence de la DLT chez les rats adultes n'est cependant pas due à l'incapacité de la synapse à développer une DLT mais plutôt à une nécessité d'adapter le protocole d'induction pour activer la machinerie indispensable à la dépression de la communication neuronale. De ce fait, d'autres protocoles de stimulation électrique permettent de déclencher une DLT chez les rats adultes. Par exemple, un protocole consistant en des paires de créneaux de courant séparées de 50ms ou 200ms et répétées 900 fois à une fréquence de 1Hz (*paired pulse low frequency stimulation* ou *PP-LFS*), ou un train de

stimulation délivrée à 5 Hz ou à 10 Hz pendant 15 min ont permis l'induction de la DLT *in vitro*, dans l'aire CA1 sur des préparations isolées d'animaux adultes âgés de 40 jours approximativement (Berretta and Cherubini, 1998; Kemp et al., 2000, p. 2000; Kemp and Bashir, 2001, p. 2001). A noter qu'il semble que la DLT induite par une PP-LFS répétée 900 fois et délivrée à une fréquence de 1Hz est bloquée par un antagoniste des récepteurs mGluRs du groupe I chez des rats adultes *in vitro* suggérant ainsi que l'induction de cette DLT fait intervenir les récepteurs mGluRs, du moins à l'âge adulte (Kemp and Bashir, 2001). Paradoxalement, un protocole de stimulation LFS, comme celui utilisé pour les jeunes animaux, est capable d'induire de la DLT chez des rats âgés de 20 à 24 mois. Cette observation suggère que de nouveaux changements touchent la machinerie de la synapse responsable de l'induction de la DLT chez les animaux très âgés, probablement via des modifications des conductances calciques (Norris et al., 1998). De manière intéressante, l'exposition au stress chez l'animal facilite l'induction de la DLT *in vitro* (Kim et al., 1996). Comme la PLT, la DLT associative peut aussi être induite via un protocole de type STDP pour lequel l'appariement entre activité pré et post synaptique est inversé par rapport à la PLT, c'est-à-dire que la stimulation de l'élément post-synaptique précède l'activité pré-synaptique (corrélation négative) (Debanne et al., 1994). L'amplitude de la DLT dépend aussi du Δt qui sépare l'activité post et pré-synaptique mais aucune DLT n'a été observée pour un intervalle de 100ms.

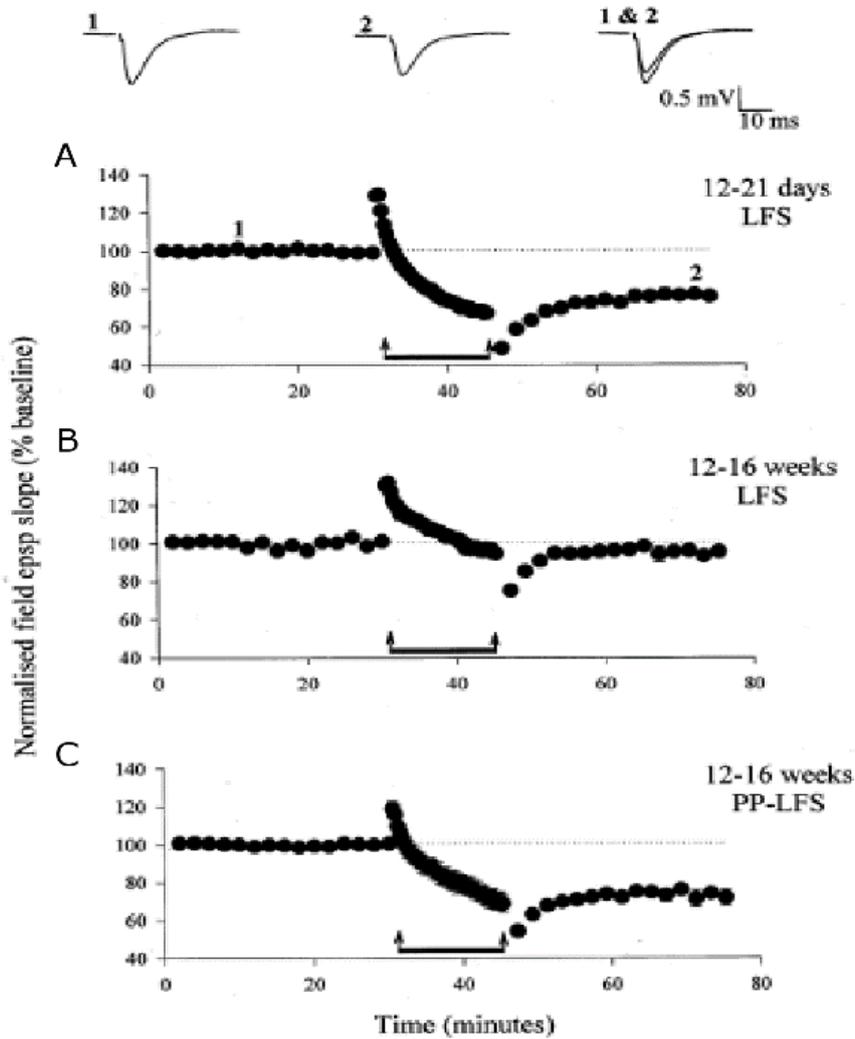


Figure 10: Le protocole d'induction de la DLT dans l'aire CA1 dépend de l'âge. L'amplitude de la DLT est reflétée par la pente du PPSE de champs. **A et B)** le protocole électrique LFS900 permet l'induction de la DLT chez les jeunes rats âgés de 12 à 21 jours post-natals mais pas chez les rats adultes âgés de 12 à 16 semaines. **C)** chez les rats adultes, la DLT a été induite en utilisant un protocole électrique consistant en une paire de stimulation espacées de 50ms et répétées 900 fois (PP-LFS) (Kemp and Bashir, 2001).

Le mécanisme d'expression de la DLT dépendante du récepteur NMDA

La stimulation électrique à faible fréquence dépolarise la membrane post-synaptique mais de façon moins prononcée que pour une stimulation à haute fréquence. Ainsi, une stimulation de type *LFS* permettra un influx de Ca^{2+} dans l'élément postsynaptique de plus faible amplitude que dans le cas d'une stimulation de type *HFS*. Ce Ca^{2+} une fois lié à la calmoduline active des phosphatases comme la calcineurine et PP1 (Cummings et al., 1996) (figure 9). L'activation de ces phosphatases coïncide avec l'inhibition des protéines kinases A et C par déphosphorylation via PP1 (Kameyama et al., 1998; Morishita et al., 2001). Ainsi, l'expression de la DLT nécessite la déphosphorylation de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA au niveau du site ser-845 localisé dans l'extrémité C-terminale (Lee et al., 2000, 1998). Cette déphosphorylation diminue la probabilité d'ouverture du récepteur AMPA (Banke et al., 2000). En outre, il a été établi que l'induction de la DLT est associée à une internalisation des récepteurs membranaires AMPA, dont ceux qui ont subi une déphosphorylation de la sous-unité GluR1, via un mécanisme dépendant du complexe clathrine AP1 (Beattie et al., 2000; Carroll et al., 1999). L'interaction de la sous-unité GluR2 avec le complexe clathrine AP2 s'avère être aussi importante pour l'internalisation des récepteurs AMPA (Lee et al., 2002). L'ensemble de ces changements de la membrane post-synaptique conduit à une diminution de la communication entre le neurone pré et post-synaptique. La diminution de la communication est reflétée par une plus faible réponse de la synapse à un même stimulus testé avant l'induction de la DLT.

III.2.2.2. La DLT dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate

Les synapses de l'aire CA1 ont la capacité de déclencher, en plus de la DLT dépendante des récepteurs NMDA, une DLT dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate. Cette DLT implique un mécanisme cellulaire différent de celui de la DLT dépendante du récepteur NMDA (Anwyl, 2006). Cette forme de DLT peut être induite expérimentalement par un protocole de paires de stimulations électriques appliquées à faible fréquence (*paired-pulse low frequency stimulation*; PP-LFS). Ce type de stimulation active les récepteurs métabotropiques du groupe I (mGluR1 et mGluR5) du compartiment extra-synaptique. Elle

peut être aussi induite chimiquement en appliquant un agoniste des récepteurs mGluR1 et mGluR5, le dihydroxyphenylglycine (DHPG) (Bellone and Lüscher, 2005 ; Huber et al., 2000) Cette forme de DLT est médiée par des modifications présynaptiques qui consistent en une réduction de la probabilité de libération vésiculaire, mais aussi post-synaptiques par le biais de l'internalisation des récepteurs AMPA.

IV. Le rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA dans la plasticité synaptique

Nous avons indiqué dans les chapitres précédents que d'une part, l'induction de la PLT ou de la DLT dépendante du récepteur NMDA dans l'aire CA1 était déterminée par la concentration de Ca^{2+} intracellulaire postsynaptique et que d'autre part, les sous-unités GluN2A et GluN2B confèrent au récepteur NMDA des perméabilités au Ca^{2+} différentes. Sur la base de ces constats, plusieurs études se sont penchées sur la question de l'influence de la composition en sous-unités du récepteur NMDA dans l'induction des processus de plasticité synaptique à long terme dépendante des récepteurs NMDA (Fetterolf and Foster, 2011; Lau and Zukin, 2007; Yashiro and Philpot, 2008).

IV.1. Rôle des sous unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la PLT

Comme déjà mentionné, le courant ionique généré par l'activation de la sous-unité GluN2B présente une cinétique d'inactivation lente et donc une perméabilité au Ca^{2+} plus grande comparée à la sous-unité GluN2A. De plus, l'interaction de la sous-unité GluN2B avec la protéine kinase CaMKII est plus importante que celle entretenue par la sous-unité GluN2A (Strack and Colbran, 1998). De ce fait, l'induction de la PLT serait favorisée par la présence de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Cette hypothèse a été confirmée par différentes études. Par exemple, le blocage de la sous-unité GluN2B par l'ifenprodil empêche l'induction de la PLT sur tranche d'hippocampe immature en culture (Barria and Malinow, 2005). Notons que dans la même étude, la surexpression de la sous-unité GluN2A a diminué la PLT. Une autre étude réalisée sur des souris adultes âgées de 4 à 6 mois a montré que la surexpression de la sous-unité GluN2B améliore la PLT (Tang et al., 1999). Bien que ces études

n'aient pas été réalisées en utilisant des animaux du même âge ni dans les mêmes conditions expérimentales, elles suggèrent un rôle important de la sous-unité GluN2B dans l'induction de la PLT. Cependant, ces observations demeurent controversées. En effet, le blocage de la sous-unité GluN2A par le NVP-AAM077 empêche l'induction de la PLT sur des tranches d'hippocampe de rats âgés de 3 à 4 semaines (Liu et al., 2004; Yashiro and Philpot, 2008). Une autre hypothèse suggère que les deux sous-unités sont essentielles pour l'induction de la PLT dans les synapses matures (Foster et al., 2010). Dans ce cas, l'induction de la PLT dépendrait de la coopération de récepteurs NMDA formés des sous unités GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2A/GluN2B. Par conséquent, à l'heure actuelle le rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la PLT n'est toujours pas claire. La variabilité des résultats obtenus peut être due à des différences dans les conditions expérimentales ou dans la souche d'animaux utilisée.

IV.2. Rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B dans l'induction de la DLT

Contrairement à ce que l'on observe pour la PLT, l'activation de la sous-unité GluN2B pourrait freiner l'induction de la DLT. Cette idée a été soutenue par l'étude de Hendricson et ses collaborateurs qui ont montré que le blocage de la sous-unité GluN2B par l'ifenprodil améliore l'induction de la DLT dans l'aire CA1 chez des rats jeunes (12 à 20 jours post-natal) (Hendricson et al., 2002). Cependant, une autre étude a montré que le blocage de la sous-unité GluN2B par l'ifenprodil et son dérivé le RO25-6981 n'a aucune incidence sur l'induction de la DLT dans l'aire CA1 (Morishita et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la sous-unité GluN2B n'est pas nécessaire pour l'induction de la DLT. D'autre part, une autre étude contredit ce résultat en montrant que l'ifenprodil bloque l'induction de la DLT sur tranche d'hippocampe de rats âgés de 3 à 4 semaines (Liu et al., 2004). Enfin, des souris déficientes pour le gène codant pour la sous-unité GluN2A ont mis en évidence le rôle de cette sous-unité dans l'induction de la DLT dans le cortex visuel (Philpot et al., 2007), mais ce résultat est aussi controversé (Zhao and Constantine-Paton, 2007). Ces travaux n'ont pas permis de montrer avec exactitude le rôle des sous-unités GluN2A et GluN2B dans les mécanismes d'induction de la DLT, il n'en demeure pas moins qu'il semble que ces sous-unités jouent un rôle important dans l'induction de la DLT.

V. Modifications des propriétés de plasticité synaptique : La métaplasticité

La plasticité de la plasticité, appelée métaplasticité, est un changement des propriétés de modification de la synapse dépendant de l'activation synaptique ou cellulaire (Abraham and Bear, 1996). Une démonstration robuste de la métaplasticité concerne la plasticité synaptique à long terme dans le cortex visuel chez des animaux ayant subi une privation visuelle. Après une période d'activité corticale réduite due à l'absence de stimuli de nature visuelle, il se trouve que pour certaines fréquences de stimulations, la PLT est améliorée alors que la DLT devient plus faible par rapport aux animaux contrôles. Ces changements sont rapidement annulés par la réexposition des animaux à la lumière (Abraham and Bear, 1996; Kirkwood et al., 1996; Philpot et al., 2007). Ces résultats expérimentaux s'accordent avec le modèle mathématique de Bienenstock et ses collaborateurs qui propose l'existence d'un seuil dans le déclenchement des modifications possibles du poids synaptique et ce, en fonction de la moyenne de l'activité neuronale (Bienenstock et al., 1982). Les formes de PLT et de DLT sujettes à des régulations métaplastiques sont dépendantes du récepteur NMDA. Il a été d'ailleurs démontré que ce dernier augmente son activité après une privation visuelle alors qu'à l'inverse, il présente une activité moindre chez les animaux exposés à la lumière (Fox et al., 1992; Philpot et al., 2003).

V.1. Le ratio GluN2A/GluN2B contrôle la plasticité

Même si comme rapporté dans les pages précédentes les rôles exacts des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA dans le déclenchement de la PLT et de la DLT, ne sont pas encore parfaitement établis, il reste certain que ces sous-unités jouent un rôle important dans l'induction de ces formes de plasticité synaptique. En combinant les observations sur le rôle de ces sous-unités et le modèle de seuil pour la plasticité synaptique évoqué par Bienenstock, il a été proposé que le seuil de déclenchement entre PLT ou DLT pour une synapse donnée, est déterminé par la composition du récepteur NMDA en sous-unités GluN2A et GluN2B exprimés dans l'épine dendritique. De fait, si le ratio GluN2A/GluN2B est élevé, il devient plus facile de déclencher une DLT alors que l'induction de la PLT nécessite alors un protocole électrique de type HFS plus intense comparé à une situation où le ratio

GluN2A/GluN2B est faible (Paoletti et al., 2013; Yashiro and Philpot, 2008)). Cette suggestion de fonctionnement se base sur le degré d'interaction de la sous-unité prédominante dans le récepteur NMDA avec la protéine kinase CaMKII ainsi que de la perméabilité au Ca^{2+} du récepteur NMDA impliqué. Ces deux caractéristiques sont plus importantes pour la sous-unité GluN2B comparée à la sous-unité GluN2A. Par conséquent, un ratio GluN2A/GluN2B important reflétant une prédominance de la sous-unité GluN2A dans les récepteurs NMDA, requière une réponse post-synaptique importante, donc une forte stimulation, afin d'augmenter suffisamment la concentration de Ca^{2+} intracellulaire postsynaptique et d'activer la protéine kinase CaMKII. Cependant, une faible stimulation, générant une réponse post-synaptique moins importante, active les phosphatases et induit alors une DLT (figure 11) (Abraham and Bear, 1996; Yashiro and Philpot, 2008). Et inversement, un faible ratio GluN2A/GluN2B diminue le seuil de déclenchement de la PLT. Dans ce cas, une réponse post-synaptique modérée devient suffisante pour augmenter le niveau de Ca^{2+} en intracellulaire et activer la protéine kinase CaMKII ce qui facilite le déclenchement de la PLT. Par conséquent, un ratio GluN2A/GluN2B faible favorise l'induction de la PLT tout en augmentant le seuil de déclenchement de DLT.

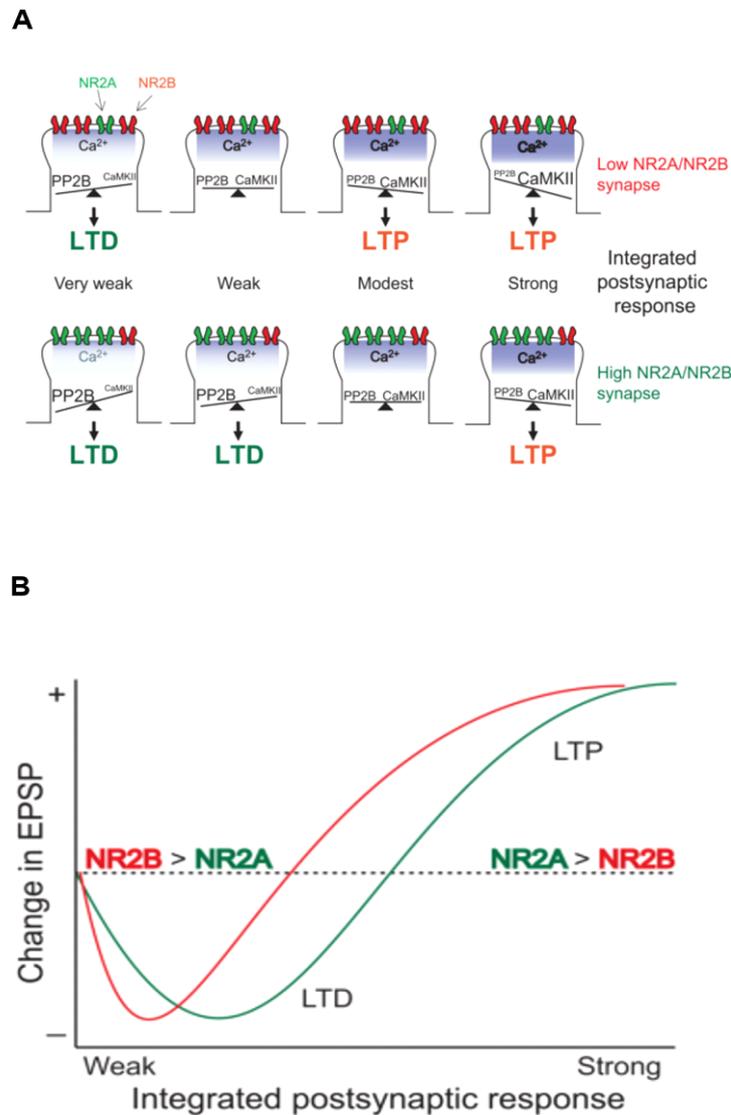


Figure 11: Le modèle théorique de la régulation de la plasticité synaptique par le récepteur NMDA. A) Un modèle explicatif des différences de seuil de déclenchement de PLT et DLT en fonction du ratio GluN2A/GluN2B exprimé dans la synapse. Pour une même fréquence de stimulation, la plasticité synaptique induite peut être distincte dû à des niveaux d'activation de la phosphatase PP2B et la kinase CaMKII différents en fonction du ratio. B) Un schéma représentant la régulation des propriétés des modifications synaptiques par le récepteur NMDA. L'axe des abscisses représente le niveau de la réponse post-synaptique (reflétant ainsi la fréquence de stimulation) et l'axe des ordonnées représente la forme de plasticité à long terme. Quand le ratio GluN2A/GluN2B est grand le seuil qui sépare l'induction de la PLT ou la DLT (appelé Θ_m) se décale vers la droite ce qui diminue la probabilité d'induction d'une PLT. A l'inverse, quand le ratio GluN2A/GluN2B est petit, Θ_m se décale vers la gauche ce qui favorise la PLT par rapport à la DLT (Yashiro and Philpot, 2008).

VI. Plasticité synaptique et apprentissage dans l'hippocampe

L'apprentissage peut être défini comme l'ensemble des mécanismes permettant d'acquérir de nouvelles informations concernant l'environnement. La mémoire, quant à elle peut être définie comme l'ensemble des mécanismes qui sont à la base du stockage de ces nouvelles informations et faisant appel certainement aux processus de plasticité synaptique. Au sein de la mémoire à long terme, on définit : *i*) La mémoire non déclarative, également appelée mémoire implicite, qui concerne le stockage et le rappel des informations de manière inconsciente comme par exemple dans le cas des apprentissages moteurs qui dépendent, entre autres, du cervelet et des ganglions de la base ; *ii*) La mémoire déclarative, appelée aussi explicite, et qui concerne le stockage et le rappel conscient des informations mémorisées de type sémantique et épisodique. Ce dernier type de mémoire dépend du lobe temporal et des structures diencephaliques telles que l'hippocampe, le subiculum et le cortex entorhinal (Squire, 1992a, 1992b). L'hippocampe a été reconnu comme jouant un rôle vital dans la formation de la mémoire déclarative. En effet, chez l'Homme, l'ablation bilatérale de l'hippocampe entraîne une amnésie rétrograde de la mémoire explicite (Scoville and Milner, 2000). Un des objectifs majeurs de la recherche en neurosciences consiste à déchiffrer les mécanismes à la base de la mémoire et des apprentissages. Un intérêt particulier a été porté à la mémoire spatiale qui fait partie de la mémoire déclarative et qui dépend fortement de l'hippocampe. Des protocoles comportementaux ont été développés afin d'examiner la mémoire spatiale chez les rongeurs comme le test de la piscine de Morris, dans lequel la capacité à se localiser dans l'espace et à se rappeler de la position d'une plateforme masquée sous la surface de l'eau, est nécessaire (Morris et al., 1982). Un autre protocole de mémoire spatiale souvent utilisé en recherche préclinique est le test de reconnaissance de nouvel objet (NOR) (Antunes and Biala, 2012). Ce test est assez simple et peut être effectué sur une période de 3 jours : jour d'accoutumance, journée d'acquisition et journée test. Au cours de l'acquisition, l'animal est autorisé à explorer deux objets. Le jour du test, l'un des objets de la session d'acquisition est remplacé par un nouvel objet. Parce que les rongeurs ont une préférence innée pour la nouveauté, si l'animal reconnaît l'objet familier, il passera la majeure partie de son temps à explorer le nouvel objet.

La PLT dans l'hippocampe a été largement étudiée et son rôle dans le phénomène de stockage d'information, des apprentissages dans le contexte de la mémoire déclarative a bien

été mis en évidence (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Nicoll, 1999). En effet, lors des tâches d'apprentissage, les voies intracellulaires de la PLT sont activées et à l'inverse le blocage des protéines de ces voies empêche le processus d'apprentissage chez l'animal (Baudry et al., 2015). Le rôle de DLT dans la mémoire, par contre, est beaucoup moins étudié. Des études récentes commencent, cependant à s'intéresser à ce sujet. Ainsi, certaines études suggèrent un rôle de la DLT dans les phénomènes d'apprentissage et dans la mémoire déclarative comme par exemple la mémoire spatiale (Ge et al., 2010). De ce fait, PLT comme DLT participent au processus de la mémoire déclarative et constituent tous les deux la base cellulaire des apprentissages.

VII. Conclusion

L'apprentissage et la mémoire sont des processus cognitifs complexes qui sont régis par la plasticité synaptique notamment la PLT et la DLT dépendantes du récepteur NMDA au niveau de l'hippocampe. Plusieurs études citées dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence l'importance de la composition en sous-unité GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA dans l'induction des phénomènes de plasticité synaptique. D'après le modèle de Bienenstock (1982), la dérégulation de la balance de ces deux sous-unités serait à l'origine d'une modification du sens de la plasticité synaptique. Ces perturbations induisent probablement un déficit d'apprentissage et de mémoire.

Chapitre III

Les effets de l'éthanol sur l'hippocampe

L'EtOH est une substance d'abus de faible poids moléculaire possédant une grande solubilité dans l'eau et dans les lipides (Deitrich et al., 1989). Ces propriétés physico-chimiques ont conduit les scientifiques à émettre une première hypothèse concernant l'action de l'EtOH sur les cellules, qui stipule que l'EtOH perturbe essentiellement la membrane cellulaire en la fluidifiant ce qui par conséquent affecte l'activité des protéines intra- et transmembranaires. Avec l'avancée de la recherche scientifique il devient maintenant clair que l'EtOH affecte aussi et directement l'activité de nombreuses protéines au sein du système nerveux central. Au niveau de l'hippocampe, plusieurs études chez l'animal ont montré que l'EtOH modifie l'activité des protéines responsables, entre autres, des transmissions glutamatergique et GABAergique ce qui, par répercussion, pourrait perturber la plasticité synaptique (Chandler et al., 1998; Pierrefiche, 2017; Zorumski et al., 2014). L'ensemble de ces modifications est associé à un déficit d'apprentissage et de mémorisation. L'objectif de ce chapitre est de présenter les effets de l'EtOH sur la transmission et la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe.

I. Ethanol et transmission glutamatergique dans l'hippocampe

Le récepteur NMDA

Tous les récepteurs ionotropiques au glutamate sont sensibles à l'EtOH mais il semble que le récepteur NMDA présente la plus grande sensibilité aux effets aigus de cette drogue. Les travaux de Lovinger et ses collaborateurs, sur culture de neurones d'hippocampe, ont permis de mettre en évidence qu'à faible concentration (5-10 mM), correspondant à une consommation de 1 à 2 verres standard d'alcool, l'EtOH inhibe le récepteur NMDA en affectant les propriétés d'ouverture du canal sans pour autant bloquer le site de liaison au glutamate (Lovinger et al., 1990a, 1990b, 1989). Ce résultat a été confirmé par la suite sur des tranches d'hippocampe, de cortex, d'amygdale, et de striatum mais aussi dans un système hétérologue comme les cellules HEK (Human embryonic Kidney) (Wright et al., 1996; Yaka et al., 2003). A plus forte concentration (≥ 60 mM), l'EtOH antagonise le site d'action du glutamate sur le récepteur NMDA, toutefois l'inhibition de ce récepteur n'est que partielle (Yaka et al., 2003). Cependant, l'effet inhibiteur de l'EtOH sur le récepteur NMDA est rapide, laissant suggérer une interaction directe entre le canal et l'EtOH. Les effets aigus de l'EtOH dépendent des sous-unités qui composent le récepteur NMDA. En effet, La sous-unité GluN1, obligatoire

pour que le récepteur NMDA soit fonctionnel, contient dans son extrémité C-terminale une cassette C0 qui semble être importante pour la sensibilité aux effets de l'EtOH (Anders et al., 2000). De plus, d'autres études ont suggéré un rôle important des domaines transmembranaires 3 et 4 de la sous-unité GluN1 dans la sensibilité du canal à l'EtOH (Ronald et al., 2001; Smothers et al., 2013). En outre, l'effet de l'EtOH sur la sous-unité GluN1 peut être différent selon le variant de la sous-unité issu de l'épissage alternatif (Jin and Woodward, 2006). De manière intéressante, dans un neurone natif, l'EtOH inhibe préférentiellement le complexe GluN1/GluN2B suggérant une grande sensibilité de la sous-unité GluN2B. D'autres études ont mis en évidence par la suite la sensibilité de la sous-unité GluN2A à l'EtOH. En ce qui concerne les sous-unités GluN2C et GluN2D, l'effet de l'EtOH sur ces sous-unités est plus faible comparé à GluN2A et GluN2B (Tsai and Coyle, 1998). Afin de pouvoir comparer la sensibilité des différentes sous-unités GluN2 à l'EtOH, il est important de prendre en considération les différences de sensibilité des différents variants de la sous-unité GluN1 associée à la sous-unité GluN2 d'intérêt. L'interaction de l'EtOH avec la sous-unité GluN2 semble impliquer l'extrémité N-terminal de la sous-unité GluN2B ainsi qu'une séquence d'acides aminés située dans le domaine transmembranaire 4 de la sous-unité GluN2A (Abraham et al., 2017; Ren et al., 2003; Ron and Wang, 2009; Smothers et al., 2013). D'autres investigations sont nécessaires afin de déterminer avec exactitude le site d'interaction de l'EtOH avec les différentes sous-unités du récepteur NMDA.

Quelques minutes d'exposition à l'EtOH induisent des modifications par phosphorylation ou déphosphorylation des sous-unités formant le récepteur NMDA ce qui pourrait participer à l'inhibition du canal (Ron and Wang, 2009). Par exemple, l'EtOH diminue le niveau de phosphorylation des sous-unités GluN2A et GluN2B effectuée par la tyrosine kinase (Alvestad et al., 2003). Au niveau de l'hippocampe, l'exposition à l'EtOH engendre l'internalisation de la sous-unité GluN2A via un mécanisme dépendant de la protéine H-Ras et de l'inhibition de la tyrosine kinase Src diminuant ainsi l'activité du récepteur NMDA (Suvarna et al., 2005). Des modifications de l'état de phosphorylation des sous-unités du récepteur NMDA peuvent également survenir après une exposition aiguë à l'EtOH. Une étude au sein de notre laboratoire a montré que deux injections aiguës d'EtOH suffisent pour induire des modifications de sensibilité du potentiel de champs de type NMDA à un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B et ce, 48 heures après l'administration de l'EtOH (Silvestre de Ferron et al., 2015). Un phénomène de tolérance, appelé tolérance aiguë, a été mis en évidence par

Grover et ses collaborateurs en 1994 dans l'aire CA1. Ce phénomène consiste en une diminution de la sensibilité du récepteur NMDA à l'EtOH 15 min suivant l'application de 60mM d'EtOH (Grover et al., 1994). Sur le plan fonctionnel, cette tolérance permettrait au récepteur NMDA de retrouver son niveau d'activation basal. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de Yaka et ses collaborateurs qui ont observé un retour à un niveau d'activité basal du récepteur NMDA, 35 min après l'exposition de la tranche d'hippocampe à 100mM d'EtOH (Yaka et al., 2003). Enfin, une exposition prolongée des neurones de l'hippocampe en culture à des doses modérées d'EtOH induit une augmentation de la quantité du récepteur NMDA dans la membrane des épines dendritiques accompagnée d'une augmentation du courant NMDA synaptique (Carpenter-Hyland et al., 2004; Ron and Wang, 2009). Cette observation suggère que l'exposition prolongée à l'EtOH est associée à un processus d'adaptation visant à augmenter le trafic du récepteur NMDA vers la synapse.

Le récepteur AMPA

Les récepteurs AMPA sont moins sensibles à l'EtOH que les récepteurs NMDA. Il n'en demeure pas moins que l'EtOH inhibe le courant AMPA au niveau de l'hippocampe chez le rat (Lovinger et al., 1990a; Puglia and Valenzuela, 2010). De manière intéressante, chez le rat âgé de 3 à 6 jours, l'EtOH inhibe les récepteurs AMPA dans les neurones granulaires du gyrus denté (sans affecter l'activité des récepteurs NMDA, insensibles aux effets de l'EtOH à cet âge). En revanche à partir de l'âge de 28 jours, l'EtOH inhibe les récepteurs NMDA mais pas les récepteurs AMPA (Mameli et al., 2005). Ce résultat suggère que l'effet inhibiteur de l'EtOH exercé sur le récepteur AMPA et NMDA est dépendant du stade de développement. L'action de l'EtOH sur les récepteurs AMPA se fait de manière non compétitive et réversible (Wirkner et al., 2000). L'EtOH agit sur toutes les sous-unités composant le récepteur AMPA mais le degré d'inhibition peut être différent d'une sous-unité à l'autre. Comme pour le récepteur NMDA, le site d'action de l'EtOH sur le récepteur AMPA n'est pas encore identifié.

A l'opposé de ce qui a été rapporté dans l'hippocampe, l'exposition prolongée à l'EtOH chez le rongeur induit une augmentation du courant AMPA dans l'amygdale et l'aire tegmentale ventrale ainsi qu'une augmentation de l'expression des sous-unités GluA1 et

GluA2 dans le cortex, le noyau accumbens et le striatum dorsal. De plus des études d'immunoréactivité post-mortem sur des cerveaux de patients alcooliques révèlent une plus grande réactivité des sous-unités GluA1 et GluA3 comparée à une personne non-alcoolique (Holmes et al., 2013).

Le récepteur kaïnate

L'effet de l'EtOH sur le récepteur kaïnate est le moins étudié. Toutefois, le laboratoire de Dr Fernando Valenzuela a montré que dans les neurones pyramidaux de l'aire CA3, les récepteurs kaïnates sont sensibles à l'EtOH et que leur sensibilité serait supérieure à celles des récepteurs AMPA et NMDA (Weiner et al., 1999). Dans l'aire CA1, ces récepteurs sont situés en position présynaptique des interneurons et leur activation permet d'augmenter la libération de GABA. En présence de 5 à 10 mM d'EtOH, les récepteurs kaïnates sont inhibés, ce qui diminue par conséquent la libération de GABA. De ce fait, le niveau d'inhibition des neurones pyramidaux de CA1 diminue aussi (Carta et al., 2003). De plus amples études sont encore nécessaires afin de mieux caractériser les effets de l'EtOH sur les récepteurs kaïnates.

II. Ethanol et transmission GABAergique dans l'hippocampe

De nombreuses études ont montré que l'EtOH permet une potentialisation de l'action du GABA sur son récepteur ionotropique GABA-A. Cet effet est similaire à l'action des benzodiazépines et des barbituriques (Criswell and Breese, 2005; Frye et al., 1980). Mais les effets aigus de l'EtOH varient selon la composition en sous-unité du récepteur GABA-A. Les premières études ont suggéré un effet plus important de l'EtOH sur le récepteur GABA-A contenant la sous-unité γ_{2L} (Wafford et al., 1991). Ce résultat a été confirmé par l'étude de Harris et ses collaborateurs qui a montré que l'EtOH augmente le flux de chlore dans un système hétérologue exprimant le récepteur GABA-A formé des sous-unités $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_{2L}$. L'implication de la sous-unité α_1 dans la sensibilité du récepteur GABA-A à l'EtOH a également été observée (Criswell et al., 1993; Mihic et al., 1994). Au niveau de l'hippocampe, les récepteurs GABA-A composés des sous-unités $\alpha_4\beta_3\delta$ et $\alpha_4\beta_2\delta$ sont situés en position extra-

synaptique et jouent un rôle important dans l'inhibition tonique des neurones. De manière intéressante, ces récepteurs GABA-A extra-synaptiques sont particulièrement sensibles à l'EtOH (figure 12-1A).

Une exposition prolongée à l'EtOH induit une modification de l'expression des sous-unités du récepteur GABA-A. En effet, l'EtOH augmente l'expression des sous-unités α_4 et α_6 , en contrepartie il diminue l'expression de la sous-unité α_1 (figure 12-2 et 3). En d'autres termes, l'exposition prolongée à l'EtOH induit un changement de la composition du récepteur GABA-A, notamment dans l'aire CA1 (Olsen and Spigelman, 2012). En outre, Les techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique ont révélé une diffusion de la sous-unité α_4 de la position extra-synaptique vers la position synaptique (Liang et al., 2006) (figure 12 - 3). De ce fait, l'exposition prolongée à l'EtOH change les propriétés physiques et pharmacologiques du récepteur.

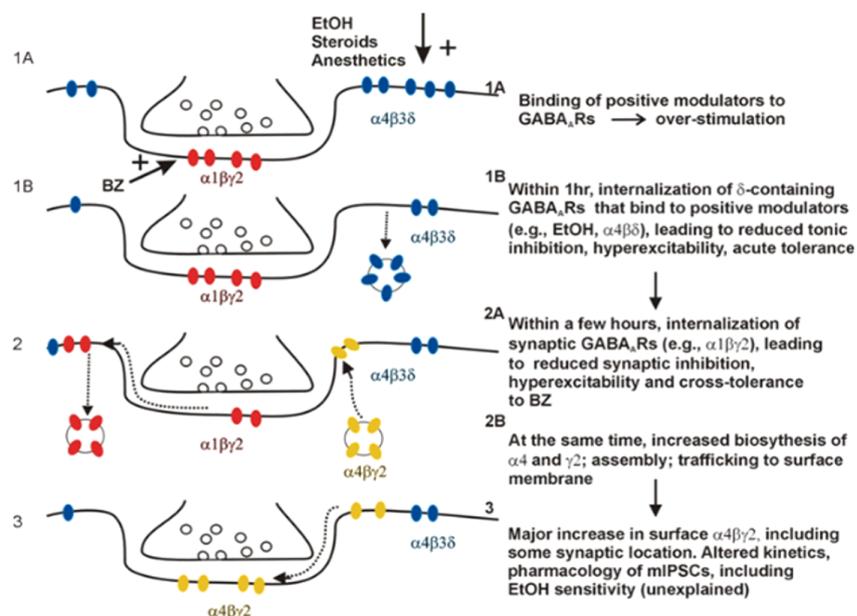


Figure 12: Hypothèse du mécanisme d'action de l'EtOH sur le récepteur GABA-A. (D'après Olsen and Spigelman.2012)

III. Ethanol et plasticité synaptique dans l'hippocampe

La consommation aigue d'EtOH induit une perte transitoire de la mémoire communément appelée « blackout » chez l'Homme et l'animal (Nelson et al., 2004; Silvestre

de Ferron et al., 2015; White, 2003). Ces défauts d'apprentissage peuvent être dus à des perturbations de la plasticité synaptique de type PLT et DLT dans l'hippocampe.

Une exposition aigue à des concentrations faibles à modérées d'EtOH (5 à 60 mM) bloque l'induction de la PLT dans l'aire CA1 (Blitzer et al., 1990; Chandler et al., 1998). L'abolition de la PLT en présence d'EtOH pourrait être expliquée par l'inhibition du récepteur NMDA. Néanmoins ce résultat est controversé (tableau 4). Par exemple, l'étude de Randall et ses collaborateurs a montré que la PLT n'est pas affectée en présence de 22 mM d'EtOH (Randall et al., 1995). Cette controverse pourrait être due aux différentes conditions expérimentales (concentrations d'EtOH, âge des animaux, protocole électrique utilisé pour l'induction de la PLT...) utilisées pour étudier l'effet de l'EtOH sur la PLT.

Contrairement à la PLT, l'effet de l'EtOH sur la DLT a été moins étudié. Une série d'expériences réalisées par Izumi et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de l'EtOH sur la DLT dans l'aire CA1 chez des rats âgés de 30 jours (Izumi et al., 2007; Zorumski et al., 2014). Ce résultat est observé quand l'EtOH est appliqué dans le bain de la tranche d'hippocampe de rat âgés de 30 à 32 jours, 15 à 30 min avant l'induction de la DLT et ce de manière dose-dépendante. En effet, une faible concentration d'EtOH (18 mM) a uniquement diminué la DLT alors qu'une concentration modérée de 60 mM l'a complètement bloqué. Le mécanisme à la base de l'inhibition de la DLT fait intervenir à la fois le récepteur NMDA et les récepteurs métabotropiques au glutamate de type 5 (Abraham et al., 2017; Overstreet et al., 1997; Zorumski and Izumi, 2012). Une étude au sein de notre laboratoire a complété ces observations en montrant que l'injection *in vivo* d'une dose de 3g/kg inhibe, après 48 heures, l'induction de la DLT au niveau de l'aire CA1 accompagné, d'un déficit d'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet (Silvestre de Ferron et al., 2015). D'autre part, l'étude de Hendricson et ses collaborateurs a montré qu'une exposition aigue à 75 mM d'EtOH améliore la DLT dans l'aire CA1 (Hendricson et al., 2002). Comme expliqué précédemment, la variabilité des résultats rapportés peut être expliquée par des différences dans les conditions expérimentales définies pour chaque étude.

La PLT est bloquée en présence d'EtOH			
Référence	Age	Stimulation	[Ethanol]
(Blitzer et al., 1990)	P50-P90	2 X 100Hz X 1s	5mM
(Sugiura et al., 1995)	P56-P63	1 X 100Hz X 0.5s	50-75mM
(Swartzwelder et al., 1995)	P15-P25	10 X 100Hz X 0.04s	60mM
(Schummers et al., 1997)	P40-P60	TBS	100mM
(Pyapali et al., 1999)	P30	TBS	10-90mM
(Izumi et al., 2005)	P30	1 X 100Hz X 1s	60mM
(Izumi et al., 2007)	P30	1 X 100Hz X 1s	40-60mM
(Fujii et al., 2008)	P120	1 X 100Hz X 0.25s	8.6mM
(Tokuda et al., 2011)	P30	1 X 100Hz X 1s	60mM
La PLT n'est pas bloquée en présence d'EtOH			
(Swartzwelder et al., 1995)	P70-P100	10 X 100Hz X 0.04s	60mM
(Randall et al., 1995)	P40-P50	2 X 100Hz X 1s	22mM
(Pyapali et al., 1999)	P90	TBS	10-30mM
(Izumi et al., 2005)	P30	1 X 100Hz X 1s	18mM
(Izumi et al., 2007)	P30	1 X 100Hz X 1s	20mM
(Fujii et al., 2008)	P120	1 X 100Hz X 0.25s	4.3mM

TBS : Theta burst stimulation

Tableau 4: L'effet d'une exposition aiguë à l'EtOH sur la PLT *in vitro* au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe (adapté d'après Zorumski et al., 2014).

IV. Conclusion

Ce chapitre s'appuie sur un ensemble d'étude montrant clairement que l'EtOH a de grandes répercussions sur les récepteurs canaux des neurones du système nerveux central, la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Cependant une grande partie de ces études a été réalisée en appliquant l'EtOH directement sur les tranches et à des concentrations importantes, ce qui ne correspondrait probablement pas aux résultats obtenus dans le cas où l'EtOH est administré *in vivo*. De plus, très peu d'études se sont focalisées sur les conséquences d'un faible nombre d'intoxication aiguë à l'EtOH et ses effets sur la transmission et la plasticité synaptique dans l'hippocampe. D'autre part, pour induire des modifications des récepteurs canaux et de la plasticité synaptique sous l'effet de l'exposition à l'EtOH, des études récentes montrent que certains facteurs épigénétiques et/ou de transcription peuvent moduler l'expression de protéines synaptiques, suggérant la participation de tels éléments dans la réponse cellulaire à l'EtOH. Cet aspect fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV

Implication des facteurs épigénétiques et transcriptionnels dans les effets de l'éthanol

I. Introduction

Le phénotype est le résultat d'interaction continue entre les gènes et l'environnement. Certains signaux intracellulaires sont régulés par l'environnement. Parmi ces signaux, il a été identifié des facteurs de transcription et des facteurs épigénétiques qui contrôlent l'expression génique. L'interaction physique entre les facteurs de transcriptions et les séquences d'ADN est très importante pour induire des modifications de l'expression génique et des modifications des fonctions cellulaires. Ces modifications sont importantes sur le plan fonctionnel au niveau cérébral car elles permettraient d'induire des adaptations dynamiques de la structure et des fonctions génomiques afin d'assurer le bon fonctionnement physiologique des capacités cognitives par exemple, comme la mémoire. Cependant, ces modifications pourraient également contribuer aux altérations cérébrales suite à la consommation de drogues comme l'EtOH. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux facteurs épigénétiques de type HDAC de classe I et au facteur de transcription HSF2. Il est donc nécessaire de décrire ici l'implication de ces facteurs dans les processus mnésiques et dans la réponse à la consommation de substances d'abus.

II. Les facteurs épigénétiques et la mémoire

II.1. L'épigénétique

Le terme épigénétique a été introduit pour la première fois par Conrad Waddington en 1942. Waddington a défini l'épigénétique comme étant l'interaction entre les gènes et leur environnement générant ainsi un phénotype donné (Waddington, 2012). Une autre définition a été proposée par Arthur Riggs plus tard qui décrit l'épigénétique comme l'ensemble des changements héréditaires dans les fonctions du génome sans pour autant changer les séquences d'ADN (Hurd, 2010; Woldemichael et al., 2014). Cette dernière définition a introduit la notion d'hérédité de l'épigénétique. Cependant, elle ne s'applique pas aux cellules qui ne se divisent pas telles que les neurones et elle ne prend pas en compte l'ensemble des changements épigénétiques qui accompagnent le fonctionnement neuronal. De ce fait, une autre définition a été adoptée combinant les deux précédentes et qui définit

l'épigénétique comme étant l'étude de tout changement potentiel, stable, idéal et héritable dans l'expression génique ou le phénotype cellulaire qui ne s'accompagne pas d'un changement dans la séquence d'ADN (Bird, 2007). Aujourd'hui nous savons que l'épigénétique englobe divers mécanismes comme la méthylation de l'ADN ou les modifications des histones par acétylation, méthylation ou phosphorylation. Certains de ces mécanismes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN par les DNA méthyltransférases (DNMT), induisent des modifications très stables alors que d'autres modifications comme l'acétylation des histones par les histones acétyltransférases (HAT) serait plus labiles et moduleraient l'expression génique sur des périodes de temps plus courtes (Borrelli et al., 2008; Weaver, 2007). Ces modifications sont importantes pour assurer les phénomènes de plasticité neuronale qui participent aux fonctions cognitives comme l'apprentissage et la mémoire, la réponse au stress chronique ou encore l'exposition aux drogues (Jirtle and Skinner, 2007). Dans le cadre de mes travaux de doctorat, je me suis intéressée aux modifications des histones via des mécanismes d'acétylation.

II.2. Mécanisme d'acétylation/désacétylation des histones

Avant d'expliquer le mécanisme d'acétylation/désacétylation, je commencerais par décrire brièvement l'état de l'ADN. Dans une cellule eucaryote au repos, l'ADN est sous forme compactée empêchant ainsi l'accès des facteurs de transcription et donc l'activation de l'expression génique. Pendant l'activation de la cellule, l'ADN « se relâche » pour permettre la liaison des facteurs de transcription, ainsi l'expression génique peut être réalisée.

L'ADN est condensé sous forme de chromatine qui est un complexe hautement organisé et dynamique constitué d'ADN et de protéines. La sous-unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome qui est constitué d'un octamère de quatre histones différentes : un tétramère des histones H3-H4 et deux dimères d'histones H2A-H2B, autour desquels s'enroulent 146 paires de bases d'ADN (Beato and Eisefeld, 1997).

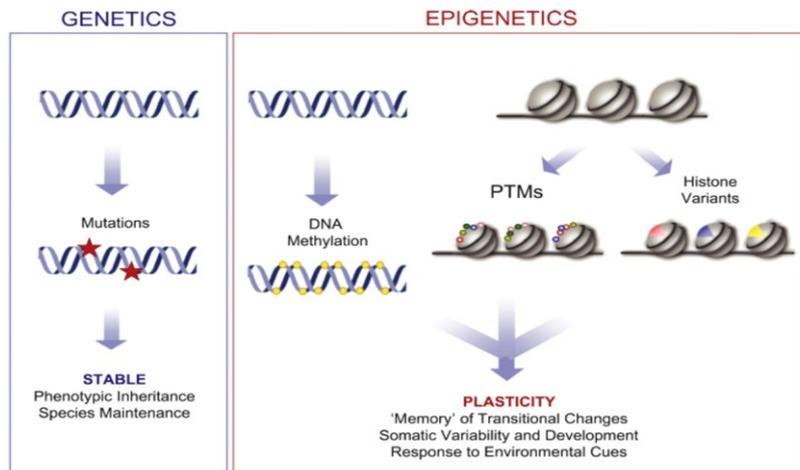


Figure 13: Contrôle génétique versus contrôle épigénétique de l'expression génique. La régulation des processus biologique peut être assurée par des mécanismes génétiques ou épigénétiques. La variation des informations génétiques est due à des mutations touchant de manière irréversible les séquences d'ADN. Le contrôle épigénétique, en contrepartie, s'applique à l'ADN, via des mécanismes de méthylation, mais aussi à la chromatine. La variation de l'état de la chromatine est due à des modifications post-traductionnelles des histones (par acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination), le changement ou le remplacement des histones et le remodelage des nucléosomes de manière ATP-dépendante altérant ainsi le contact avec l'ADN. L'ensemble de ces modifications participent aux phénomènes de plasticité neuronale afin d'assurer les fonctions cognitives et adaptatives à l'environnement (Borrelli et al., 2008)

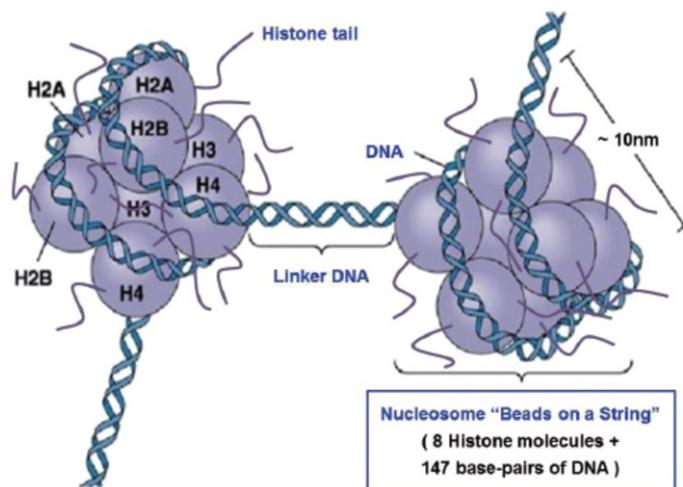


Figure 14: Représentation schématique d'un nucléosome. Le nucléosome constitue l'unité de base de la chromatine. Le core du nucléosome est constitué d'un octamère [(tétramère H3-H4) X 2 + (dimère H2A-H2B) x 2]. La double hélice d'ADN est enroulée autour de cet octamère (Kim, 2014).

Les histones peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles mais le mécanisme d'acétylation des résidus lysine situés dans le domaine *N*-terminal des histones est le plus connu. Les histones H3 possèdent cinq sites d'acétylation, les histones H4 et H2B en possèdent quatre et les histones H2A n'en possèdent qu'un seul (Sun et al., 2003). L'acétylation des résidus apporte une charge négative qui neutralise la charge positive de la lysine et qui réduit ainsi l'interaction entre l'extrémité *N*-terminal de l'histone et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Cette modification permet l'ouverture de la chromatine, on parle alors d'euchromatine. De ce fait l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN devient plus facile et l'activation de la transcription des gènes peut être déclenchée (Clayton et al., 2006; Day and Sweatt, 2011; Fincham, 1997; Kouzarides, 2007). La désacétylation, phénomène inverse de l'acétylation, renforce l'interaction entre les histones et l'ADN ce qui favorise la condensation de la chromatine, on parle alors d'hétérochromatine. Dans ce cas, la transcription des gènes est limitée.

Les histones sont acétylées par les HATs et désacétylées par les HDACs. Les HATs sont moins étudiées que les HDAC. Toutefois, nous savons qu'il existe 17 familles de HAT et les plus importants et les plus connus sont, la CREB binding protein (CBP), la p300, ATF-2, SRC1-3, Tip60 et CLOCK (Day and Sweatt, 2011).

En ce qui concerne les HDACs, actuellement on en dénombre dix-huit, identifiées chez les mammifères. Ces HDACs sont subdivisées en quatre classes basées sur leurs homologues identifiés chez la levure (Bolden et al., 2006; Verdin et al., 2003). La classe I comporte les formes HDAC1, 2, 3 et 8 qui montrent une homologie avec Rpd3 chez la levure. Ces HDACs sont généralement localisées au niveau nucléaire. La classe II est composée des HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10. Cette classe II a été divisée en deux sous-classes : la classe IIa (HDAC4, 5, 7 et 9) et IIb (HDAC6 et 10). Les HDACs de classes II sont exprimées de manière spécifique dans certains tissus et possèdent la capacité de transiter entre le noyau et le cytoplasme à l'aide de protéines de transport comme la protéine 14-3-3. Cette capacité de transit suggère que la classe II des HDACs pourrait avoir un rôle dans l'acétylation d'autres protéines que les histones (Chen et al., 2015; Kazantsev and Thompson, 2008). La classe III est constituée des sirtuines (Sirt1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7). La structure et la fonction des sirtuines sont différentes par rapport aux autres HDACs (Michishita et al., 2005). Enfin, HDAC11 est le seul membre de la classe IV. L'activité enzymatique des classes I, II et IV des HDACs dépend de la présence de zinc. De plus

l'ensemble de ces HDACs est sensible aux mêmes inhibiteurs comme la trichostatine A (TSA), le Sodium Butyrate (NaB) ou l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA). Par contre, l'activité enzymatique des sirtuines de la classe III est dépendante du nicotinamide NAD⁺ et cette classe est insensible à l'effet inhibiteur de la TSA.

Les noms des histones acétyltransférases et des histones désacétylases viennent du fait que les premières protéines dont on a découvert l'acétylation ou la désacétylation par ces enzymes sont les histones. Cependant, les histones ne sont pas les seules protéines à pouvoir être modifiées par ces enzymes. Plus de 50 autres protéines peuvent être acétylées/désacétylées par ces enzymes comme par exemple des facteurs de transcription ou des protéines de cytosquelette (Minucci and Pelicci, 2006). C'est la raison pour laquelle ces enzymes sont impliquées dans plusieurs pathologies comme le cancer, l'hépatite et certaines pathologies du système nerveux central comme les addictions ou encore les troubles de la mémoire.

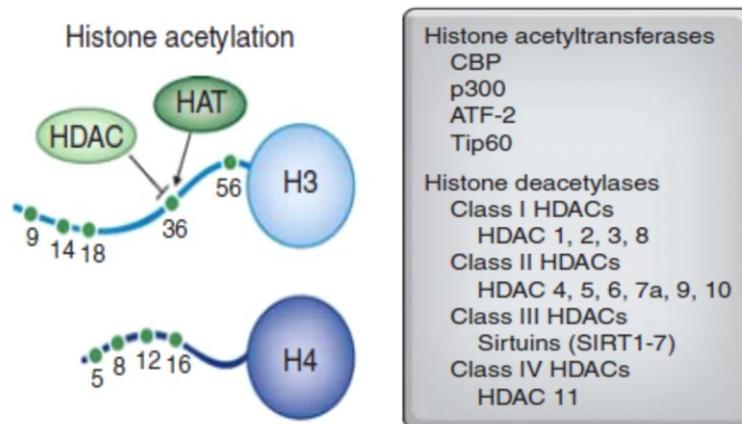


Figure 15: Acétylation des histones. Plusieurs résidus lysine sont situés dans l'extrémité N-terminal des histones. L'acétylation est catalysée par les HATs et la désacétylation est assurée par les HDACs. L'acétylation permet l'activation de la transcription des gènes. A droite, la liste de plusieurs enzymes HATs et HDACs. Les différents isoformes des HDACs sont classifiés en quatre classes. L'expression des isoformes HDACs est différente d'une structure cérébrale à l'autre. Ces isoformes participent à la régulation des différentes fonctions cognitives (Adapté d'après Day and Sweatt., 2012).

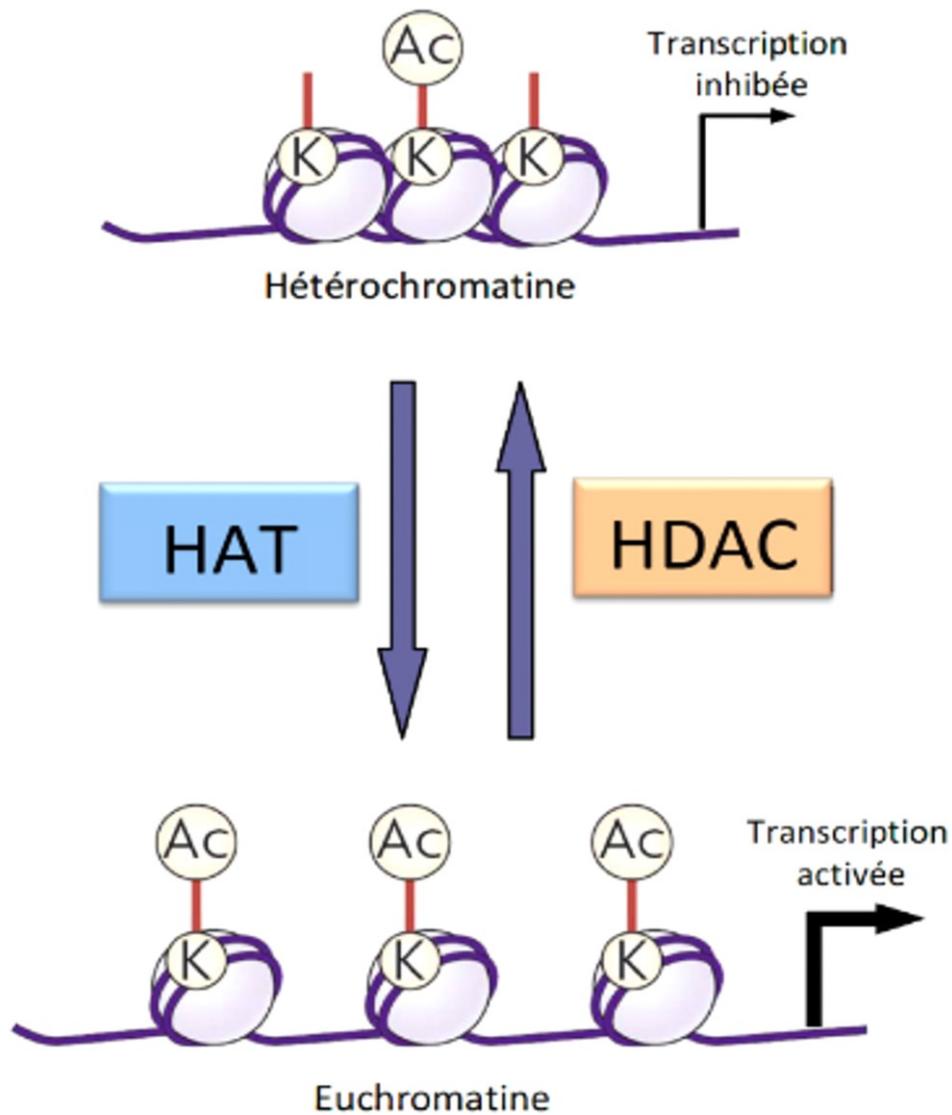


Figure 16: Balance acétylation / Désacétylation des histones. Quand elle est dans un état désacétylé, la chromatine est condensée (hétérochromatine), inhibant ainsi la transcription de l'ADN. les HATs acétylent les histones, ce qui entraîne une décondensation de la chromatine (euchromatine), permettant la transcription génique. Les HDACs, quant à elles, désacétylent les histones et recondensent l'euchromatine en hétérochromatine. La lettre K indique l'acide aminé lysine. (Kazantsev and Thompson, 2008; Legastelois et al., 2017).

II.3. Les HDACs et la mémoire

Un aspect très intrigant de la mémoire a suscité l'attention de Francis Crick. Il s'agissait de la persistance des souvenirs alors que les processus biologiques à la base de la mémoire ne tiennent finalement que quelques jours. Il a donc émis l'hypothèse que les informations sont stockées dans le cerveau grâce à des modifications réversibles de l'ADN et des protéines qui sont responsables des changements du poids de la synapse (Crick, 1984). Depuis, des études récentes supportent l'hypothèse de l'implication des modifications post-traductionnelles des histones dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Par exemple, il a été suggéré que le déclin cognitif dans les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer serait lié à une augmentation des HDACs qui participerait aux altérations de l'expression des protéines impliquées dans la plasticité synaptique d'apprentissage (Sen, 2015).

En ce qui concerne la mémoire, la majorité des travaux de recherche visant à étudier le rôle de ces HDACs a été réalisé dans l'hippocampe. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'activité des HDACs de classe I améliore la mémoire et l'apprentissage et ce, en augmentant la PLT enregistrée sur des tranches d'hippocampe (Levenson et al., 2004; McQuown et al., 2011; Stefanko et al., 2009; Vecsey et al., 2007). A l'aide d'un test de reconnaissance de nouvel objet, l'étude de Stefanko a montré que l'inhibition des HDACs induisait une amélioration de la mémoire qui persiste au-delà d'une capacité normale (Stefanko et al., 2009).

Concernant HDAC1, une étude a montré que la surexpression de HDAC1 dans l'hippocampe dorsal chez la souris facilite l'apprentissage dans un contexte de conditionnement aversif et que l'inhibition de HDAC1 perturbe cet apprentissage (Bahari-Javan et al., 2012). Ces auteurs ont montré que durant l'apprentissage, HDAC1 est recruté afin d'exprimer des gènes associés à la plasticité synaptique comme *cFos*. Ce résultat suggère que HDAC1 est important pour l'apprentissage aversif. Une étude très intéressante de Guan et de ses collaborateurs, utilisant des souris transgéniques qui surexpriment HDAC1 ou HDAC2 dans les neurones a montré que la surexpression de HDAC2, mais pas de HDAC1, perturbe la mémoire spatiale dans un test de piscine de Morris (labyrinthe aquatique). Ceci a été accompagné d'une diminution de la densité des épines dendritiques et d'une perturbation de

la plasticité synaptique mesurée sur tranche d'hippocampe de souris âgées de 6 mois (Guan et al., 2009). En outre, la surexpression de HDAC2 est associée à une réduction de la quantité de la protéine H4 acétylée. A l'inverse, chez une souris transgénique déficiente pour le gène HDAC2, la quantité de la protéine H4 acétylée, particulièrement au niveau des sites lysine en position 5 et 12 (acH4K5 et acH4K12) est augmentée dans l'hippocampe et la mémoire spatiale améliorée (Schmauss, 2017). La surexpression de HDAC2 perturbe aussi l'expression de certains gènes impliqués dans la plasticité synaptique comme le gène du facteur neurotrophique *Bdnf*, le gène *cFos* et le gène *Gria1* du récepteur ionotropique AMPA (Day and Sweatt, 2011; Schmauss, 2017). Ces résultats montrent que HDAC2 régule négativement la plasticité synaptique et la mémoire et que l'inhibition de cette forme particulière d'HDAC faciliterait l'apprentissage et la mémoire. L'implication de HDAC3 a été particulièrement mise en évidence dans la formation de la mémoire à long terme car les souris déficientes pour le gène codant pour HDAC3 présentent une meilleure mémoire dans un test de reconnaissance de nouvel objet comparées aux souris sauvages. L'absence de HDAC3 induit aussi une diminution de l'expression de HDAC4 et une augmentation de acH4K8 (McQuown et al., 2011).

L'ensemble de ces observations suggèrent que les HDACs de la classe1 (HDAC1, HDAC2 et HDAC3) sont impliquées dans la formation de la mémoire. Cependant parmi ces HDACs, HDAC2 a été proposé comme étant l'acteur majeur empêchant la formation de la mémoire et des apprentissages (Gräff and Tsai, 2013).

Il est intéressant de constater que malgré la connaissance que nous avons du rôle du récepteur NMDA dans la plasticité synaptique et les apprentissages, peu d'études se sont finalement intéressées à la régulation de l'activité du récepteur par des facteurs épigénétiques et inversement aux modifications épigénétiques induites par l'activation du récepteur NMDA (Jarome and Lubin, 2014). Toutefois, il semble que les modifications post-traductionnelles des histones et les méthylations de l'ADN surviennent après l'activation du récepteur NMDA. En effet, l'inhibition du récepteur NMDA empêche l'augmentation de l'acétylation des histones H3 au niveau du striatum (Li et al., 2004). De plus, l'activation du récepteur NMDA diminue les niveaux de H3K9me2 et augmente la méthylation de H3K4 ainsi que l'acétylation de H3K9/14 au niveaux du promoteur du gène *bdnf* dans une culture de neurones d'hippocampe ce qui augmente l'expression de ce gène (Tian et al., 2009). Cette augmentation de BDNF peut être aussi expliquée par le fait que l'activation du récepteur NMDA diminue aussi l'interaction

entre HDAC1 et le promoteur du gène *bdnf* dans des neurones de l'hippocampe en culture (Tian et al., 2010). Ces évidences suggèrent qu'il existe une régulation des mécanismes épigénétiques par le récepteur NMDA mais d'autres études sont nécessaires afin de pouvoir déchiffrer avec exactitude l'ensemble des modifications épigénétiques induites par l'activation du récepteur NMDA ainsi que les modifications qui concernent le récepteur NMDA suite à l'activation de processus épigénétiques.

D'autres HDACs semblent être aussi impliquées dans les processus d'apprentissage et de la mémoire, comme SIRT1, qui suite à son activation par le resvératrol, améliore les apprentissages dans un modèle de souris Alzheimer (Kim et al., 2007). Ainsi, contrairement aux autres HDACs, il semble que Sirt1 renforce la formation de la mémoire (Gao et al., 2010).

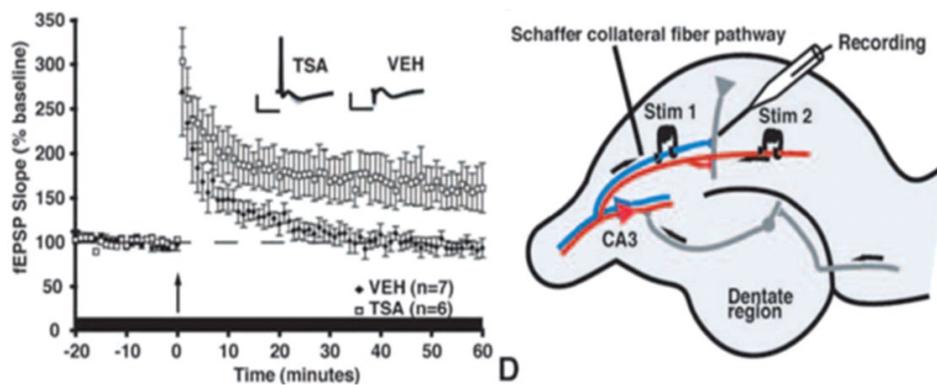


Figure 17: La TSA, un inhibiteur des HDACs, améliore la PLT. La PLT a été induit expérimentalement par un train de stimulation de 100Hz sur des tranches d'hippocampe de souris mâles de 8 à 16 semaines ayant reçu un véhicule (VEH) ou une injection de TSA (1,65µM) en intracerebroventriculaire (icv). Les tranches d'hippocampe issues des souris traitées avec le véhicule ne présentent qu'une potentialisation transitoire qui disparaît après 30min d'enregistrement. En revanche, les tranches d'hippocampe des souris traitées avec la TSA présentent une PLT plus robuste qui tient dans le temps (Vecsey et al., 2007).

Anatomic structure	HDAC activity	Histone modifications	plasticity-associated genes affected	Cognitive functions affected
Hippocampus ^a	↑HDAC2	↓acH4K12, acH3	↓Bdnf I/II, Egr1, Gria1, Fos	↓associative and spatial learning
Hippocampus ^b	↓HDAC2	↑acH4K5, acH4K12	not reported	↑associative and spatial learning
Hippocampus ^b	↑HDAC1	↓acH3K9	↓Fos, Egr2	↑fear extinction
Hippocampus ^c	↓HDAC3	↑H3K9me3 ↑ acH4K8	↑Nr4a2	↑long-term memory

Tableau 5: Rôle des HDACs de la classe I dans la mémoire (Schmauss, 2017)

II.4. Le mécanisme acétylation / désacétylation et la réponse aux substances d'abus

Avant de s'intéresser à l'EtOH de manière particulière, il est important de parler des drogues d'une manière plus générale. Il a été démontré que l'exposition à une drogue induit des modifications de l'expression génique (Renthal and Nestler, 2009) et il est maintenant reconnu que les drogues induisent des modifications de la chromatine ce qui permet de moduler le profil d'expression de certains gènes impliqués dans les changements neuronaux et comportementaux associés à la consommation de la drogue. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de ces modifications demeurent mal connus. Chez l'Homme comme chez l'animal, l'administration de drogue produit des adaptations d'ordre épigénétique (Kim and Shukla, 2006; Manzardo et al., 2012). Les modifications post-traductionnelles des histones induites par la drogue sont principalement de type acétylation, phosphorylation et méthylation. Prenons l'exemple de la cocaïne, les premières études mettant en évidence l'implication des modifications de la chromatine dans la réponse à cette drogue ont montré qu'une exposition aiguë à la cocaïne augmente rapidement l'acétylation de H3 et H4 au niveau des promoteurs des gènes *cFos* et *fosB* dans le striatum, deux gènes connus pour jouer un rôle important dans les modifications du comportement lié à la consommation de la drogue (Kumar et al., 2005). L'exposition prolongée à la cocaïne induit aussi des modifications de la chromatine. En effet, les promoteurs de certains gènes comme *cdk5* (cycline-dependent kinase5), *bdnf*, *npv* (neuropeptide Y), *sirt1* et *sirt2* sont hyperacétylés après une exposition chronique à la cocaïne augmentant ainsi le niveau d'expression de ces gènes (Renthal and Nestler, 2009). Les outils pharmacologiques inhibant les HDACs, ce qui augmente par conséquent l'acétylation dans certaines régions cérébrales comme le striatum ventral, une région très impliquée dans le phénomène de la récompense suite à la consommation des drogues, potentialisent les effets locomoteurs induits par la

consommation de la cocaïne (Kumar et al., 2005; Renthal et al., 2007; Renthal and Nestler, 2009). Ces observations suggèrent que les modifications de la chromatine pas des mécanismes d'acétylation participent à la régulation de l'expression génique après l'administration de drogue et que les manipulations pharmacologiques visant à augmenter l'acétylation de la chromatine potentialisent la réponse comportementale à la drogue.

En ce qui concerne l'EtOH, plusieurs études ont exploré la capacité de cette drogue à moduler le taux global d'acétylation des histones. Cependant, elles ont fourni des résultats contradictoires. La diversité des résultats peut être expliquée par les différences dans les conditions de traitement des animaux, des régions cérébrales analysées et de l'âge des sujets.

Une des premières études, visant à comprendre l'implication de la balance entre acétylation et désacétylation est celle d'Agudelo et ses collaborateurs en 2011 qui a permis de mettre en évidence qu'une exposition *in vitro* à l'EtOH des neurones humains augmente l'expression de HDAC2 associée à l'expression des espèces réactives de l'oxygène responsable d'un stress oxydant. Néanmoins, le traitement de ces cellules avec la TSA bloque cette augmentation de HDAC2 en présence d'EtOH (Agudelo et al., 2011). Ainsi, cette étude pointe le rôle protecteur des inhibiteurs des enzymes HDAC. Une autre étude concernant l'implication des phénomènes d'acétylation dans le sevrage à l'EtOH montre que l'arrêt d'une exposition chronique d'une lignée de neurones de souris provoque une augmentation de l'acétylation de H3K9 au niveau du promoteur du gène *grin2B*, codant pour la sous unité GluN2B du récepteur NMDA (Legastelois et al., 2017). De ce fait, outre le lien direct entre l'exposition à l'EtOH et l'expression de la sous-unité GluN2B, cette étude montre que plutôt qu'une modification globale de l'activité HDAC ou HAT, l'EtOH induit des modifications locales au niveau de certains promoteurs particuliers. On peut globalement estimer qu'une augmentation des taux d'acétylation des histones H3 et H4 dans certaines structures cérébrales est observée suite à l'administration aigue d'EtOH (Kim and Shukla, 2006).

Comme rappelé précédemment, les conséquences de l'EtOH, *in vivo*, sur l'acétylation des histones dans le cerveau dépendent de l'âge et de la structure étudiée. En effet, une étude a montré que chez des rats adolescents, contrairement aux adultes, l'EtOH induit une altération de l'acétylation des histones (Pascual et al., 2009). De plus, des résultats différents peuvent être observés chez le même sujet en fonction de la région cérébrale analysée. Par

exemple, cette même étude a révélé que l'EtOH induit une augmentation de l'acétylation dans le striatum ventral mais une diminution dans le striatum dorsal (Pascual et al., 2009).

III. Les facteurs de transcription de type HSF

III.1. Introduction

Les organismes vivants, des bactéries aux mammifères, répondent tous à une élévation de la température en activant la synthèse d'un ensemble de protéines formant la famille des « Heat Shock Protein » (HSP). Les HSPs sont des protéines chaperones qui ont pour rôle de faciliter le repliement des protéines et de prévenir la formation d'agrégats protéiques dans le but de restaurer l'homéostasie suite à un choc thermique (Gomez-Pastor et al., 2018; Richter et al., 2010). Différents facteurs ont été identifiés comme déclencheurs des HSPs tel que le stress oxydant, les infections bactériennes, les métaux lourds, certaines pathologies comme la maladie d'Huntington mais aussi l'EtOH (Akerfelt et al., 2010; El Fatimy et al., 2014; Gomez-Pastor et al., 2018). L'activation des protéines HSPs déclenche une « heat shock response » (HSR), un mécanisme commun à tous les facteurs déclencheurs et contrôlée par une famille de facteurs de transcription, les « heat shock factors » (HSF) (Lindquist, 1986). Ces HSFs reconnaissent des séquences répétées de pentamère nGAAn d'ADN appelées les « Heat shock elements » (HSE) situés dans les promoteurs des gènes *hsp*. La liaison des HSFs à cette séquence permet l'activation de la synthèse des HSPs. La première étude qui a permis de mettre en évidence l'interaction entre les HSFs et les HSEs et l'induction de l'expression des HSPs a été réalisée chez la drosophile *melanogaster*. Ensuite, ces observations ont été élargies aux mammifères. La famille des HSFs peut être formée d'un seul membre comme chez les invertébrés ou de plusieurs comme chez les vertébrés et les plantes (Nover et al., 2001; Wu, 1995, p. 19995). Chez l'Homme, six HSFs ont été identifiés (HSF1, HSF2, HSF4, HSF5, HSFX et HSFY). HSF2 possède 2 isoformes (HSF2 α et HSF2 β). HSF4 possède aussi 2 isoformes (HSF4 α et HSF4 β) et HSFY en possède 3 (HSFY1, HSFY2 et HSFY3). Ces isoformes peuvent être exprimés de manière spécifique selon le tissu (Fiorenza et al., 1995). Il est maintenant évident que la famille des HSFs, et particulièrement les deux membres les plus étudiés à savoir HSF1 et HSF2, joue un rôle important dans la réponse cellulaire à différents facteurs environnementaux

(Vihervaara et al., 2013). HSF1 est considéré comme le membre le plus important de la famille des HSFs puisque son absence ne peut pas être remplacée par un autre HSF (Gomez-Pastor et al., 2018). A titre d'exemple, l'activation de HSF2 suite à un choc thermique nécessite l'expression de HSF1 probablement en formant un hétérodimère HSF1-HSF2 (He et al., 2003). Dans ce chapitre je décrirai les facteurs de transcription HSF1 et HSF2 ainsi que leurs rôles dans le système nerveux central puis dans la réponse à l'EtOH.

III.2. Rôle physiologique des HSFs

Les HSFs jouent un rôle essentiel dans le développement cérébral et les fonctions cérébrales en modulant la migration cellulaire, la formation et le maintien de la synapse ainsi que dans la résistance des cellules face à un stress protéotoxique.

III.2.1. Rôle de HSF1 dans le système nerveux central

HSF1 est le membre de la famille HSF le plus étudié et qui semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la machinerie cellulaire responsable du contrôle de la réponse au stress mais aussi dans les fonctions cognitives comme la mémoire. En effet, HSF1 est important pour la différenciation neuronale et le fonctionnement de la synapse lors des processus d'apprentissage et de consolidation de la mémoire en augmentant l'expression des HSPs (Gombos et al., 2011; Haldimann et al., 2011; Hooper et al., 2016; Neef et al., 2011). Au niveau de l'hippocampe, l'absence de HSF1 engendre une diminution de la longueur des prolongements dendritiques des neurones granulaires du GD ainsi qu'une diminution de la densité des épines dendritiques, réduisant ainsi la formation des synapses (Gomez-Pastor et al., 2018; Hooper et al., 2016). Dans la corne d'Ammon, les souris déficientes pour le gène codant pour HSF1 montrent aussi une diminution de la longueur des dendrites des neurones pyramidaux (Uchida et al., 2011). De plus, l'absence de HSF1 induit une réduction de la prolifération neuronale et augmente la différenciation prématurée des neurones (Liu et al., 2014). HSF1 joue aussi un rôle dans la formation des radeaux lipidiques membranaires qui participent à la stabilisation de la membrane post-synaptique rendant possible l'activité des récepteurs membranaires, nécessaires pour la formation de la mémoire (Gomez-Pastor et al.,

2018; Nagy et al., 2007). HSF1 active aussi l'expression du facteur neurotrophique BDNF qui contribue à la survie des neurones et régule la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Chen et al., 2014) ; Ces observations supportent le rôle essentiel de HSF1 dans le maintien structural et le bon fonctionnement des neurones de l'hippocampe.

La perte de HSF1 induit des troubles moteurs qui peuvent être liés à des altérations de la myélinisation perturbant ainsi l'activité des neurones des ganglions de la base ou du cervelet. Il a été montré que HSF1 est associé à des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Huntington ou de Parkinson (Kondo et al., 2013; Verma et al., 2014). En effet, une faible activation de HSF1 dans un modèle animal de la maladie d'Huntington ou de Parkinson peut faciliter la progression de la maladie (Hooper et al., 2016).

III.2.2. Régulation de l'activation d'HSF1

A l'état physiologique, le monomère HSF1 interagit directement avec la protéine chaperonne HSP90, rendant HSF1 inactif. Lors d'un stress protéotoxique, la structure de HSF1 change (Hentze et al., 2016) accompagnée d'une rapide diminution de l'interaction entre HSF1 et HSP90 permettant la trimérisation de HSF1 (Zou et al., 1998). En effet, l'inhibition de HSP90 est suffisante pour activer HSF1. Il a été montré que HSF1 s'associe aussi à HDAC6 ; ce dernier est capable de détecter la présence d'agrégats protéique et déclenche, par conséquent, la dissociation du complexe HDAC6/HSF1/HSP90 induisant ainsi l'activation de HSF1 (Boyault et al., 2007). L'interaction de HSF1 avec les HSPs constitue un mécanisme important pour la régulation de HSF1 pendant un stress protéotoxique.

HSF1 est aussi régulé par des modifications post-traductionnelles. La technique de spectrométrie de masse a montré qu'il existe au moins 12 résidus sérine qui subissent une phosphorylation pendant un choc thermique (Guettouche et al., 2005) permettant ainsi son activation. La phosphorylation de HSF1 est effectuée par différentes kinases comme ERK1/2, MAPK-APK2 (MAPK-activated protein kinase 2), PKC et GSK3 β (Glycogen Synthase kinase 3 beta) (Chu et al., 1996; Soncin et al., 2003). En revanche, la sumoylation de HSF1 inhibe son activité. Cette modification post-traductionnelle n'affecte pas la stabilité de HSF1 ce qui suggère qu'il existe probablement d'autres acteurs, en plus de la sumoylation, qui participent à son inhibition (Anckar and Sistonen, 2011). HSF1 subit aussi des modifications post-

traductionnelles par acétylation. Ce facteur de transcription contient en effet, différents sites d'acétylation qui permettent de réguler son activation pendant un stress protéotoxique. Cette acétylation est contrecarrée par Sirt1 ce qui induit une interaction prolongée de HSF1 avec le promoteur du gène *Hsp70* augmentant ainsi son expression (Westerheide et al., 2009).

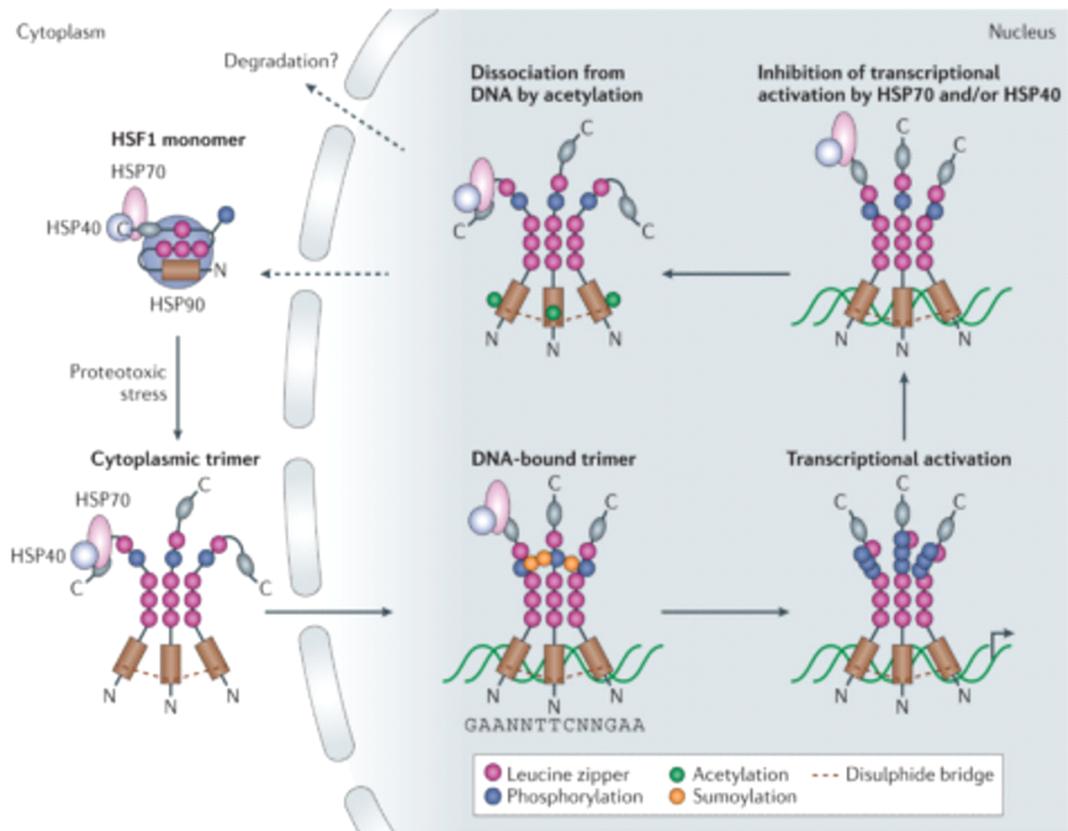


Figure 18: Cycle d'activation et d'atténuation de HSF1. En absence de stress cellulaire, le monomère HSF1 est inactivé en interagissant avec HSP90, HSP70 et HSP40. La phosphorylation des résidus sérine 303 et 307 inhibe aussi son activation. Lors d'un stress protéotoxique, HSP90 se lie aux protéines mal-repliées et se dissocie de HSF1 permettant ainsi la trimérisation de HSF1 et sa translocation dans le noyau afin de se lier aux HSE et activer l'expression des gènes de réponse cellulaire. HSP70 est capable de s'associer à HSF1 même lors de son interaction avec l'ADN et réprimer ainsi son activation. Suite à la liaison à l'ADN, HSF1 subit une modification post-traductionnelle de type sumoylation, un autre moyen de répression de l'activité de HSF1. L'activation de HSF1 est réprimée principalement par un mécanisme de rétrocontrôle négatif par HSF40 et HSP70. Une fois HSF1 acétylé au niveau de la lysine80, il se dissocie de l'ADN. Cependant, il n'est pas clair, si le trimère de HSF1 est ensuite dissocié en monomères qui se retrouvent de nouveau dans le cytoplasme ou il est dégradé (Neef et al., 2011).

III.2.3. Rôle de HSF2 dans le système nerveux central

Comparé à HSF1 qui est essentiel pour la réponse au stress protéotoxique, HSF2 semble être plutôt associé aux processus de différenciation pendant le développement cellulaire dans le cerveau pendant le développement embryonnaire et dans les gamètes des deux genres.

HSF2 est hautement exprimé dans le neuroépithélium de plusieurs vertébrés (Abane and Mezger, 2010). Pendant le développement embryonnaire, HSF2 est exprimé lors de la prolifération des neurones progéniteurs de la zone ventriculaire. Il est aussi exprimé dans la plaque corticale qui formera les six couches du cortex (Chang et al., 2006; Kallio et al., 2002). De plus, chez les rongeurs, dans certaines régions cérébrales en développement comme le striatum, le cortex, le bulbe olfactif ou encore le mésencéphale, la liaison de HSF2 à l'ADN est constitutive (Abane and Mezger, 2010). Les souris déficientes pour le gène codant pour HSF2 sont viables mais elles montrent un élargissement des ventricules latéraux ainsi qu'une réduction de la taille de l'hippocampe et du striatum et de l'épaisseur du cortex chez l'adulte (Kallio et al., 2002). Cependant, trois laboratoires ont généré des souris transgéniques déficientes pour *hsf2* et ces défauts cérébraux n'ont pas été observés chez toutes les souches transgéniques (Kallio et al., 2002; McMillan et al., 2002; Wang et al., 2003). Ceci peut être expliqué par une différence dans l'inactivation du gène. De plus, une étude dans le laboratoire de Dr Mezger a montré que HSF2 est impliqué dans la migration des neurones corticaux qui sont générés dans la région interne du cortex en développement et qui doivent subir une migration radiale afin d'atteindre leur position finale (Chang et al., 2006). Contrairement à HSF1, l'interaction entre HSF2 et l'ADN disparaît rapidement après la naissance des rongeurs associée à une forte diminution de l'expression de HSF2 (Abane and Mezger, 2010; Morrison et al., 2000). Cependant, l'expression de HSF2 augmente notamment dans le cervelet, dont le développement se produit en post-natal (Morrison et al., 2000). Chez l'adulte, HSF2 est localisé principalement dans les dendrites et le cytoplasme des neurones néanmoins son niveau d'expression est faible (Brown and Rush, 1999).

En dépit des faibles niveaux d'expression de HSF2, ce dernier semble être impliqué dans la réponse au stress protéotoxique mais son activation dépend de la présence de HSF1. En effet, HSF2 est capable de moduler d'une manière transitoire la réponse HSR en activant ou en

inhibant l'expression des gènes *hsp* (He et al., 2003). De plus, des études récentes montrent que HSF2 joue un rôle important dans le cas d'une fièvre ainsi que d'une élévation modérée de la température (Shinkawa et al., 2011).

III.2.4. Rôle de HSF2 dans la gamétogénèse

HSF2 joue aussi un rôle important dans la gamétogénèse. En effet, les souris déficientes pour le gène codant pour HSF2 montrent une diminution de la fertilité chez les souris femelles, ce qui peut être dû à un défaut au niveau ovarien, une diminution des taux d'ovulation, mais aussi une augmentation de la létalité embryonnaire après implantation (Kallio et al., 2002; Wang et al., 2003). Chez les souris mâles, l'absence de HSF2 induit des perturbations de la maturation des cellules germinales, une réduction de la taille des testicules et une augmentation de la mort des spermatozoïdes (Abane and Mezger, 2010; Kallio et al., 2002). Les techniques de biologie moléculaire ont révélé environ 500 promoteurs activés par HSF2 au niveau des testicules chez la souris.

III.2.5. Régulation de l'activation de HSF2

Pendant le développement, l'expression de HSF2 est principalement régulée au niveau transcriptionnel et elle est différente selon les tissus et le stade de développement (Fiorenza et al., 1995). Contrairement à HSF1, lorsque HSF2 est inactivé, il est généralement présent sous forme de dimère (Abane and Mezger, 2010; Fiorenza et al., 1995). De plus, HSF2 est une protéine très labile avec un temps de demi-vie de 60 min (Mathew et al., 1998) et l'accumulation de HSF2 dans le cytoplasme semble participer à son activation. En effet, l'augmentation de l'expression de HSF2 est suffisante pour induire sa translocation et l'expression des gènes cibles (Mezger et al., 1989; Sandqvist et al., 2009). Comme pour HSF1, l'activation de HSF2 nécessite aussi la formation d'un homotrimère. Peu de données existent à l'heure actuelle concernant la régulation *in vivo* de la capacité de HSF2 à se lier à l'ADN ou à activer la transcription des gènes. En revanche, les études *in vitro* et *ex vivo* illustrent un rôle important des modifications post-traductionnelles comme la sumoylation et l'acétylation dans la régulation de l'activité de HSF2 (Abane and Mezger, 2010; Björk and Sistonen, 2010).

III.2.6. HSF1, HSF2 et l'EtOH

Durant la dernière décennie, de plus en plus d'évidences montrent que HSF1 et HSF2 sont impliqués dans la réponse à l'EtOH, même si là encore, les mécanismes mis en jeu restent mal connus.

Il a été établi que la consommation d'EtOH augmente le niveau d'expression et d'activation de HSF1 (Collins et al., 2010; Varodayan et al., 2011), ce qui augmente par conséquent l'expression des HSPs. De manière intéressante, l'activation de HSF1 suite à la consommation d'EtOH joue un rôle protecteur dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer pour lequel l'expression de HSF1 et HSPs, induite par l'EtOH, diminue les dommages mnésiques dus au peptide amyloïde (Belmadani et al., 2004). De plus dans un modèle de consommation conditionnée, l'EtOH augmente l'expression de HSF1 ce qui induit l'expression de certaines protéines synaptiques essentielles pour les phénomènes de plasticité synaptique et d'apprentissage comme la synaptotagmine I, PSD95 et le récepteur NMDA (Collins et al., 2010; Varodayan et al., 2011).

D'autres études se sont plutôt focalisées sur l'implication de HSF1 et HSF2 dans un stress pendant la vie foetale comme une exposition prénatale à l'EtOH. Ce type d'alcoolisation augmente l'expression des HSPs chez le rongeur et chez l'Homme (Hashimoto-Torii et al., 2011; Pignataro et al., 2007). Parmi tous les membres de la famille HSF, HSF1 a été le plus étudié. Dans le cas d'une exposition prénatale à l'EtOH, HSF1 est plutôt localisé au niveau nucléaire afin de se lier à l'ADN et déclencher l'expression des HSPs (Pignataro et al., 2007). En revanche, l'activation de HSF1 concerne aussi d'autres gènes impliqués dans la neurotransmission comme *Gabra4*, codant pour la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur GABA_A, ainsi que d'autres protéines de la machinerie vésiculaire (Pignataro et al., 2007; Varodayan et al., 2011). Ces observations suggèrent que HSF1 jouerait un rôle important dans la régulation de la transmission synaptique suite à une exposition prénatale à l'EtOH. Récemment, une étude réalisée dans le laboratoire du Dr Mezger a montré l'implication de HSF2 dans la réponse à une exposition prénatale à l'EtOH. En effet, ce type de stress induit un maintien d'activation de HSF2 ainsi que des défauts de migration radiale des cellules corticales pendant le développement embryonnaire. Cependant, les souris déficientes pour le gène codant pour HSF2 présentent moins d'anomalies. (El Fatimy et al., 2014). Cette étude propose un modèle

dans lequel HSF1 et HSF2 forment un hétérotrimère spécifique pour lequel l'activation de HSF1 dépend de l'activation de HSF2. L'hétérotrimère formé par HSF1 et HSF2 se lie aux promoteurs des gènes codant pour des protéines de migration neuronale et perturbe leur expression. En revanche, en absence de HSF2, ces perturbations sont moins prononcées. De ce fait, HSF2 est considéré comme un médiateur de défauts de migration neuronale au niveau cortical après une exposition prénatale à l'éthanol.

IV. Conclusion

Les facteurs épigénétiques tout comme les facteurs de transcription de type HSF sont capables de moduler l'expression génétique de certaines protéines synaptiques. Les études visant à comprendre la régulation de la plasticité synaptique par les mécanismes épigénétiques sont beaucoup plus nombreuses que celles ciblant particulièrement les HSFs, notamment celles concernant HSF2. En examinant la littérature étudiant HSF2, nous apercevons surtout son rôle dans le cancer mais rarement dans les pathologies liées au cerveau chez l'adulte. Ainsi, le lien exact entre HSF2 et plasticité synaptique reste flou. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes plutôt basés sur la régulation des protéines synaptiques par HSF1. Il n'en demeure pas moins que les travaux de Dr Mezger ont permis de mettre en évidence l'implication de HSF2 dans la réponse prénatale à l'EtOH.

Dans ce contexte, lors de mes travaux de thèse, je me suis intéressée aux mécanismes épigénétiques dans le cas de consommation aigue d'EtOH mais aussi, le rôle de HSF2 dans la régulation de la synapse en condition physiologique basale et suite à une exposition prolongée à l'EtOH.

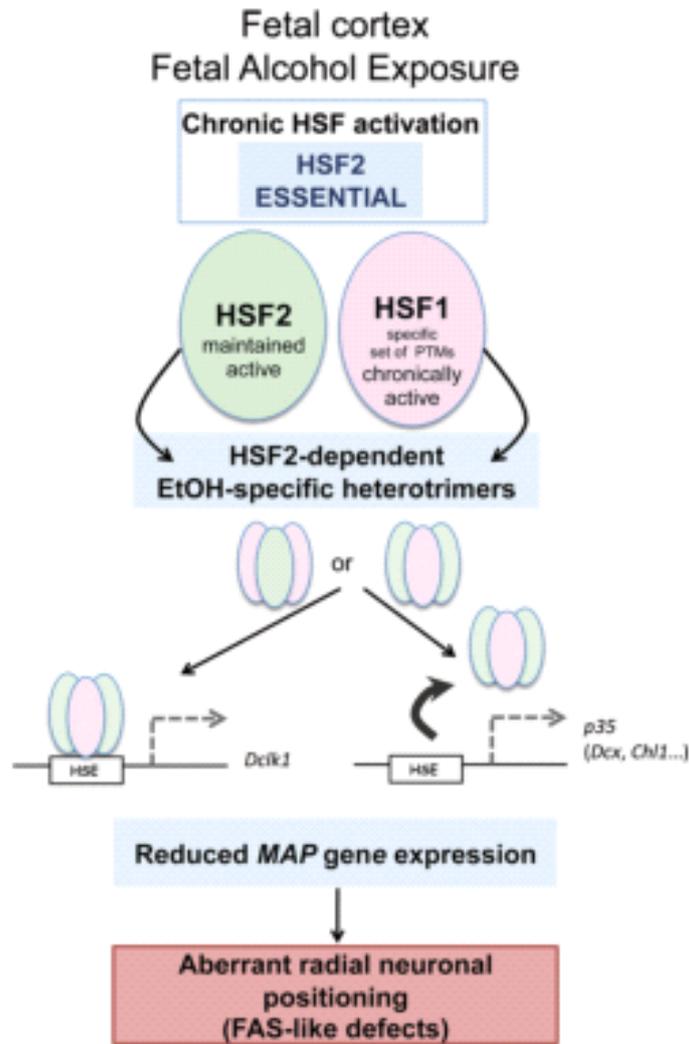


Figure 19: Modèle d'action de HSF2 dans les défauts de migration radiale au niveau cortical suite à une exposition prénatale à l'EtOH. L'activation de HSF2 permet d'activer HSF1 formant ainsi un hétérotrimer spécifique. Ce dernier une fois dans le noyau, se lie aux promoteurs de gènes codant pour des protéines de migrations radiale des cellules corticales et perturbe leur expression engendrant ainsi des défauts de migration (El Fatimy et al., 2014)

Question scientifique

Quel que soit la forme de la consommation d'alcool, aigue ou chronique, l'éthanol induit des troubles de mémoire et des apprentissages en altérant particulièrement le fonctionnement des récepteurs au glutamate de type NMDA, récepteurs essentiels pour l'induction de la plasticité synaptique. Nous avons auparavant montré au sein de notre équipe que deux épisodes de binge drinking suffisent pour abolir la DLT et perturber les apprentissages chez les rats jeunes adultes, probablement en augmentant le signal GluN2B du récepteur NMDA (Silvestre de Ferron et al., 2015). Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la sous-unité GluN2B dans les effets neurophysiologiques de la consommation d'EtOH, en revanche peu d'études s'intéressent au rôle de la sous unité GluN2A. Récemment l'étude de Jury et ses collaborateurs a montré la participation de la sous-unité GluN2A au développement de la dépendance à l'alcool (Jury et al., 2018). Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse a été d'étudier les modifications des sous-unité GluN2A et GluN2B après une consommation aigue et chronique d'alcool au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe et de déterminer ses répercussions sur les phénomènes de plasticité synaptiques et particulièrement la dépression à long terme, très peu étudiée après la consommation d'alcool.

Le second objectif de ma thèse vise à déterminer les facteurs participant aux modifications du récepteur NMDA et de la plasticité synaptique. En effet, Outre la forme de la consommation d'alcool, les effets de l'EtOH sur l'hippocampe sont influencés par plusieurs autres facteurs comme l'âge et le genre. Récemment, une nouvelle hypothèse émerge concernant l'implication des facteurs épigénétiques comme les (HDAC) (Jeanblanc et al., 2015) dans les

effets de l'EtOH sur le cerveau. Cette hypothèse nous a conduit à se pencher sur la question de l'implication des HDACs dans les modifications du récepteur NMDA, de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe et des apprentissages sous l'effet de l'EtOH.

Une autre hypothèse, encore plus récente concerne cette fois les facteurs de transcription de type HSF. Les travaux de Dr Mezger montre que l'absence de HSF2 chez des souris transgéniques prévient les défauts de migration des cellules corticales pendant le développement induit par une alcoolisation fœtale (El Fatimy et al., 2014). Dans ce cadre, nous nous sommes posés la question d'un éventuel rôle de HSF2 dans les modifications des sous-unités GluN2A et GluN2B et donc sur la DLT suite à l'exposition chronique à l'EtOH en libre choix chez la souris femelle adulte.

Matériels et Méthodes

I. Animaux

En ce qui concerne l'étude de l'implication de facteurs épigénétiques dans les effets du *binge drinking* sur la mémoire, nous avons utilisé des rats mâles Sprague Dawley en fin d'adolescence, âgés de 45-55 jours (Schneider, 2013). Ces rats sont issus de l'élevage « Charles River » et ont été hébergés dans une animalerie climatisée selon un cycle de 12h jour/12h nuit. Ils avaient un accès *ad libitum* à de la nourriture standard et à de l'eau. Concernant l'étude du facteur de transcription HSF2, nous avons utilisé des souris C57Bl/6 femelles adultes (âgées de 90-110 jours) sauvages (WT) ou transgéniques déficientes pour le gène codant pour le facteur de transcription HSF2 (*hsf^{-/-}*). Une fois arrivés dans notre animalerie, ces animaux ont été hébergés par 3 ou 4 et laissés au repos une semaine (habituation) puis individualisés pour débiter le protocole d'alcoolisation.

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux règles de la communauté européenne traitant de l'utilisation des animaux de laboratoire (2010/63/UE, CE. Octobre 2010) et en accord avec le décret français n°2013-118. Les procédures ont toutes été autorisées par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Picardie (CREMEAP-projet n°3829).

I.1 Modèle de « *Binge Drinking-like* »

Nous avons étudié chez le rat l'implication de l'épigénome dans les effets du *binge drinking* pendant l'adolescence. Pour cela, nous avons formé quatre groupes de rats *i)* Le premier a reçu 2 injections d'éthanol à 3g/kg (20% v/v) administrées à 9h d'intervalle par voie intrapéritonéale (i.p) (Silvestre de Ferron et al., 2015). *ii)* Le deuxième a reçu 2 injections d'éthanol (3g/kg ; 20% v/v) espacées de 9h mais chacune a été précédée (30min avant) d'une injection par voie i.p de sodium butyrate (NaB), un inhibiteur HDAC, à raison de 600 mg/kg (Simon-O'Brien et al., 2015) *iii)* Le 3^{ème} groupe a reçu 2 injections de sérum physiologique constituant ainsi le groupe contrôle et *iv)* Le 4^{ème} groupe a reçu 2 injections de NaB espacées de 9h. 48h après les différents traitements, les rats ont été utilisés pour des expériences d'électrophysiologie, de comportement, de western Blot et d'immunohistochimie.

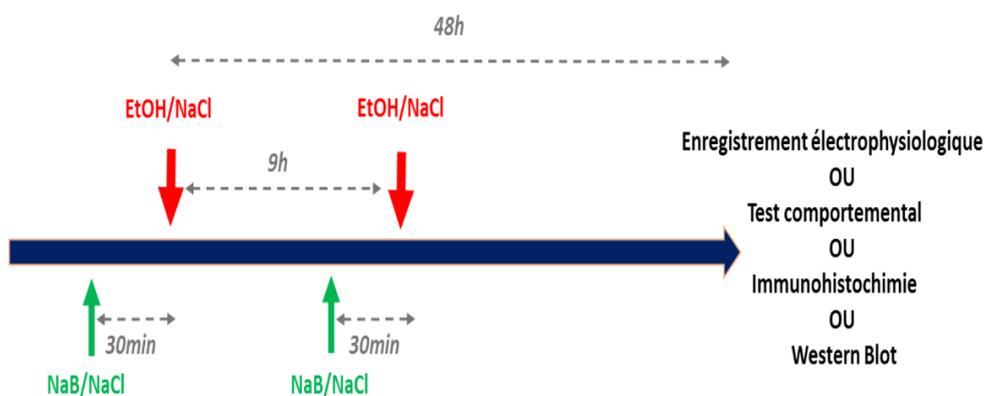


Figure 20: Protocole d'injection des différents groupes de rats

I.2 Modèle de consommation chronique d'éthanol en libre choix

Chez la souris, nous avons évalué l'implication de HSF2 dans les modifications de l'excitabilité et de la plasticité synaptique des neurones pyramidaux de CA1 avant et après une consommation chronique à l'EtOH en libre choix. Pour cela, nous avons exposé les souris WT et *hsf*^{-/-} à 2 biberons : le premier contenant de l'éthanol (10% v/v) et le deuxième contenant de l'eau. L'animal a donc le choix entre boire de l'eau ou de l'alcool en continu pendant 4 semaines. Durant cette période, les biberons d'eau et d'éthanol ont été pesés 3 fois par semaine. A la fin du protocole, la consommation d'éthanol, en g/kg/jour, et la préférence en pourcentage d'éthanol consommé par rapport à la consommation totale des fluides, ont été déterminées. Avant de réaliser les expériences électrophysiologiques, le biberon d'éthanol a été remplacé par de l'eau pendant une semaine après la fin du protocole afin d'éviter les effets dus au sevrage.

II. Electrophysiologie

II.1 Préparation des tranches d'hippocampe

Les rats et les souris ont été anesthésiés à l'isoflurane puis sacrifiés par décapitation. Rapidement, la boîte crânienne est enlevée et le cerveau est récupéré puis immergé dans une solution de coupe (tableau 6) saturée en oxygène à l'aide de carbogène (95% O₂, 5% CO₂, pH

7.2) et maintenue à 4°C afin de limiter l'activité métabolique et l'excitabilité cellulaire. Le cervelet et le cortex préfrontal sont ensuite retirés. Le bloc de tissu contenant l'hippocampe est collé sur sa face rostrale, à une platine, puis il est sectionné en tranches coronales de 400µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1200S). Les tranches récoltées, et contenant l'hippocampe, sont transférées dans du liquide céphalorachidien (LCRa) (tableau 6) oxygéné et maintenu à température ambiante pendant au moins 2 heures afin que les cellules retrouvent leur activité métabolique et leur excitabilité. Une fois les 2h écoulées, une tranche est transférée dans la chambre d'enregistrement contenant du LCRa oxygéné (95% O₂, 5% CO₂, pH 7.2) circulant à 6ml/min et chauffé à 28°C.

	Concentration en mM		
	Solution de coupe		LCRa
	Utilisée pour le rat	Utilisée pour la souris	Utilisée pour le rat et la souris
NaCl	0	126	125
KCl	2	2.5	3
NaH₂PO₄	1.3	1.1	1.25
NaHCO₃	26	18	25
MgCl₂	6	1.4	1.3
CaCl₂	0.2	0.5	2.3
Glucose	10	11	10
Sucrose	220	0	0
Acide ascorbique	0	1	0

Osmolarité= 300mOsm ; pH = 7.2

Tableau 6: Concentration en mM des différents constituants des solutions de coupe et du liquide céphalorachidien artificiel (LCRa)

II.2 Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe. Une électrode de stimulation bipolaire (SNEX-200x100mm, Phymep, France) couplée à un stimulateur (Stimulus Isolator A360, WPI, Royaume-Uni) était insérée dans le *stratum radiatum* de l'aire CA1. L'ensemble des caractéristiques de la stimulation ont été configurées via un stimulateur (A310 Accupulser, WPI, Royaume-Uni). Ces stimulations consistaient en des créneaux de courant de 0,1 ms de durée, de fréquence et d'intensité modulables. L'électrode d'enregistrement consistait en un fil d'argent insérée dans une micropipette de verre (1-3 M Ω) étirée à partir d'un capillaire de borosilicate (Harvard Apparatus 1,5 mm O.D x 1,17 mm ID. Phymep, France) et remplie d'une solution de NaCl (3M). L'électrode d'enregistrement était placée dans *le stratum pyramidale* ou dans le *stratum radiatum* pour enregistrer les potentiels d'action de champs (PS ; *population spike*) ou les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE), respectivement. Le signal recueilli a été amplifié via un amplificateur P511 AC de chez GRASS, filtré à 3KHz puis transmis à un logiciel d'acquisition de donnée Signal (CED, Cambridge, Royaume-Uni) par le biais d'une interface (micro 1401, CED).

La procédure d'enregistrement débute par la recherche d'une réponse synaptique ou dendritique, selon l'expérience. Seules les tranches d'hippocampe qui présentent une réponse somatique supérieure ou égale à 2mV ont été utilisées. Afin de s'assurer de la stabilité de la réponse, un délai de 30min minimum a été respecté. Toutes les expériences ont été précédées de l'établissement d'une courbe Intensité-Réponse (I/O). Celle-ci permet de déterminer l'amplitude de la réponse maximum ainsi que l'intensité test de stimulation choisie à 50% de la réponse maximum. Afin d'établir la courbe I/O, l'intensité de stimulation a été augmentée de 20 μ A en 20 μ A jusqu'à atteindre la réponse maximum. Les créneaux de courant de stimulation ont été délivrés à une fréquence de 0.033Hz ou 0.1Hz pour les expériences visant à étudier la DLT ou la PLT respectivement. À la suite de l'établissement de la ligne de base, pendant laquelle la réponse présente une stabilité d'au moins 10min, un protocole d'induction a été lancé. Dans le but d'induire une DLT, 2 protocoles électriques ont été utilisés selon l'espèce : pour les rats adolescents, le protocole consistait en deux stimulations espacées de 200ms répétées 900 fois à 1Hz (*Paired Pulse Low Frequency Stimulation* ; ppLFS 200-900 ; *Kemp et al., 2000*). Chez la souris, le protocole utilisé consistait en 900 stimulations à 1Hz (*Low*

Frequency Stimulation ; LFS900). Les stimulations délivrées à haute fréquence (*HFS pour High Frequency Stimulation*) consistaient en : *i*) 3 trains de stimulations à 100Hz ou *ii*) 2 trains de stimulation à 50Hz ou encore *iii*) 2 trains de stimulations à 20Hz. Toutes ces stimulations ont une durée de 1 seconde. Après la fin du protocole d'induction, l'enregistrement de la réponse s'étend sur une période d'au moins 60min. Pour certaines expériences, des substances pharmacologiques ont été ajoutées dans le LCRa circulant dans la chambre d'enregistrement dans le but de bloquer des cibles membranaires. Dans ce cas, après l'obtention de la ligne de base, la substance pharmacologique est ajoutée, puis après stabilisation de la réponse à la substance, une nouvelle ligne de base a été établie avant d'appliquer le protocole électrique.

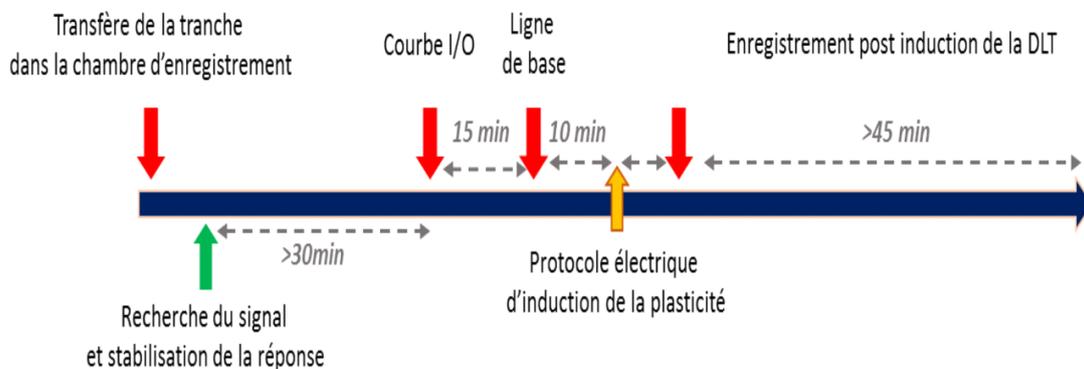


Figure 21: Protocole type d'une expérience d'électrophysiologie suivie pendant ces travaux de thèse

Dans le but de déterminer le rôle du récepteur NMDA, le PPSE-NMDA a été isolé pharmacologiquement en utilisant un LCRa contenant 0.1mM de magnésium afin d'éviter le blocage Mg^{2+} du récepteur NMDA. Ce LCRa contient en plus, 50 μ M de bicuculine et 10 μ M de CNQX qui servent à bloquer les récepteurs $GABA_A$ et AMPA, respectivement. A la fin de chaque enregistrement, 50 μ M d'acide DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic (APV), antagoniste du récepteur NMDA, ont été ajoutés dans le LCRa circulant pour vérifier la sensibilité du PPSE à cette substance pharmacologique. Les modifications touchant les sous-unités du récepteur NMDA ont été évaluées grâce à des antagonistes spécifiques de la sous-unité GluN2A et GluN2B à savoir le NVP-AAM077 (20nM) (Neyton and Paoletti, 2006) et RO25-6981 (5 μ M ou 10 μ M) respectivement (Silvestre de Ferron et al.,2015).

Afin de déterminer si des modifications présynaptiques surviennent sous l'effet de l'éthanol, des protocoles de facilitation neuronale (*paired pulse facilitation : PPF*) ont été utilisés. Ces stimulations pairées ont été séparées de différents délais : 50ms, 100ms, 150ms, 200ms, 250ms et 300ms.

II.3 Analyse des signaux électrophysiologiques

L'analyse du potentiel d'action de champ (PS) s'effectue en mesurant son amplitude entre le point maximum du premier pic positif et le point minimum du premier pic négatif (figure 22). Cette analyse nous a permis de déterminer les modifications d'amplitude du PS induites par un protocole de PLT ou de DLT. Toutes les réponses ont été moyennées par minute. Les amplitudes de PLT ou de DLT en mV étaient quantifiées pendant les 10 dernières minutes d'enregistrement et comparées aux 10 minutes de la ligne de base. Ces amplitudes étaient exprimées en pourcentage de l'amplitude du PS mesuré au cours de la ligne de base.

Les analyses du PPSE-NMDA consistaient en la mesure de la pente du PPSE exprimée en mV/s. Tout comme le PS, la pente du PPSE a été moyennée par minute. Les effets des antagonistes GluN2A et GluN2B sur la pente du PPSE étaient comparés à la pente mesurée au cours des 10 minutes de ligne de base et exprimés en pourcentage de diminution par rapport à la ligne de base.

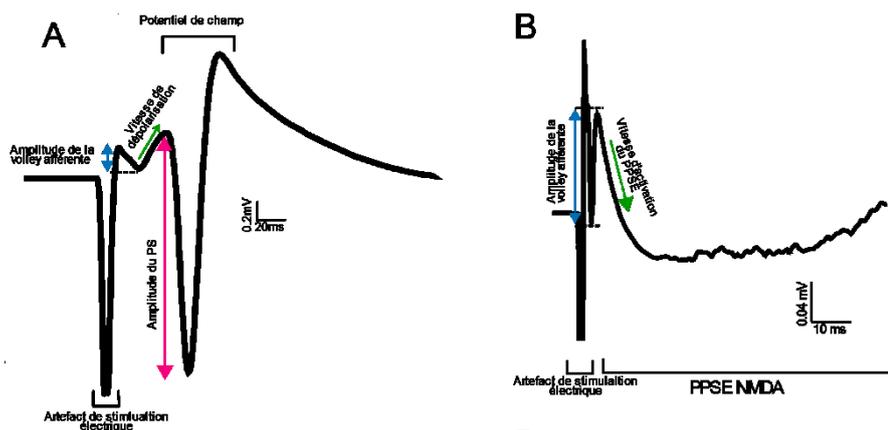


Figure 22: Exemple des signaux enregistrés ainsi que les paramètres analysés

III. Tests Comportementaux

III.1 Test de reconnaissance de nouvel objet chez le rat adolescent

Pour le test de reconnaissance de nouvel objet nous avons utilisés les mêmes groupes d'animaux décrits plus haut, à savoir des rats adolescents ayant reçus ou pas 2 injections i.p d'éthanol (3g/kg) chacune précédées (30 min avant) ou pas d'une injection i.p de NaB (600mg/kg) et un groupe ayant reçu deux injections de sérum physiologique. Quarante-deux rats ont été utilisés pour évaluer la capacité d'apprentissage dans le modèle de *binge drinking*. Une fois reçu dans notre animalerie, les animaux ont été acclimatés pendant une semaine et manipulés une fois tous les 2 jours dans le but de diminuer leur niveau de stress. Une semaine avant le test comportemental, tous les animaux ont reçu une injection d'une solution saline par voie i.p une fois tous les 2 jours et ont été introduits dans la boîte de test dans le but de diminuer l'anxiété et de s'habituer à l'environnement et aux injections. Le test a été réalisé dans une boîte en plexiglass en forme de cube (45x45x45cm) ouverte par le dessus et illuminée à une intensité de 30 lux. Trois objets (A, B et C) de formes différentes ont été choisis pour ce test. Ces objets ont été placés de manière à garder la même distance par rapport au centre de la boîte. Après 10min d'habituation dans la boîte vide, les rats passent 10min en présence de 2 objets (A et B) placés en diagonale (Phase1 d'acquisition ou d'apprentissage, figure 23). La deuxième phase (phase test, ou rétention ou reconnaissance) a été effectuée 48h après la phase1 pendant laquelle un objet a été remplacé par un nouveau (Objet C). Durant tout le test, les animaux ont été filmés à l'aide d'une caméra infrarouge et d'un système d'acquisition digital (Pinnacle Studio HD v.15 software). Les analyses des vidéos ont consisté à mesurer le temps total d'exploration du nouvel objet pendant les 5 premières minutes de l'enregistrement. Nous avons pris en compte tous les types de contact entre animal et l'objet. L'exploration a été normalisée et exprimée en pourcentage du temps que l'animal passe avec le nouvel objet C comparé à l'objet familier (A ou B). Les rats qui ont présenté une très faible locomotion ou un temps d'exploration inférieur à 10s ont été exclus de l'étude

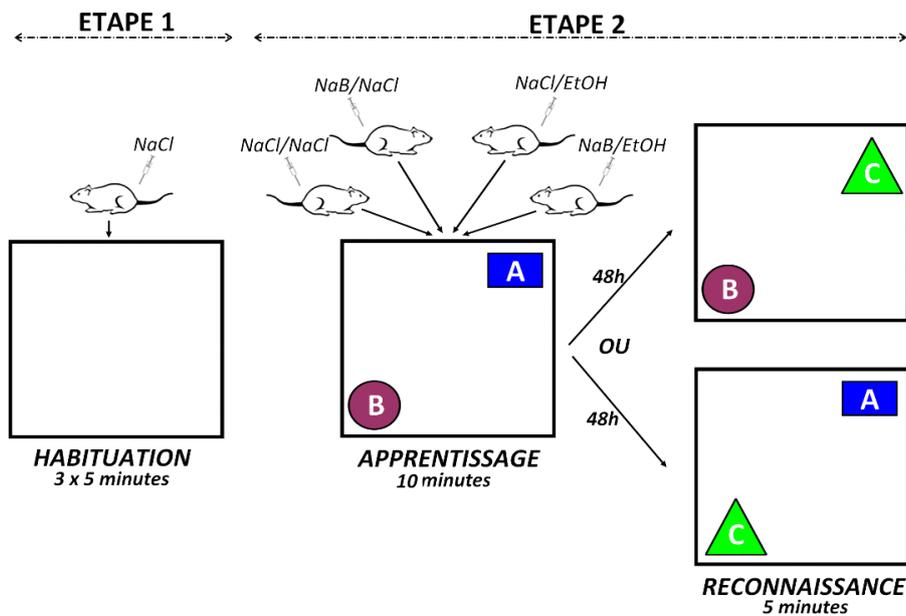


Figure 23: Schéma explicatif du test de reconnaissance de nouvel objet chez le rat adolescent

IV. Techniques de biologie cellulaire

IV.1. Western Blot

Les protéines cytosoliques de la région CA1 ont été extraites dans une solution tampon Nonidet P40 contenant 1% NP40, 50mM Tris Ph 7.5, 10% glycérol, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 100mM Na₃VO₆, 0.5mM phenylmethanesul-phonyl fluoride (PMSF), 5mg/ml aprotinin, 5mg/ml leupeptin et 2mg/ml pepstatin). Les protéines nucléaires du CA1 ont été extraites dans la même solution tampon en présence d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche) et 1% TritonX100. Des quantités équivalentes des homogénats des protéines ont été séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide (SDS-PAGE : gel de sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide) et ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose incubée en présence d'anticorps anti HDAC2 (ab32117, abcam), anti GAPDH (#2118, Cell Signaling Technology) et anti actine (#4967, Cell Signaling Technology). L'intensité de la protéine cible et de la protéine de référence (β -actine) ont été exprimées en rapport d'intensité protéine cible/ β -actine.

IV.2. Immunohistochimie

Des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées permettant d'évaluer l'expression des protéines HDAC 2, H3 acétylé (ac-H3) et H4 acétylé (ac-H4) au niveau de la région CA1 (Alaux-Cantin et al., 2014 ; Simon-O'Brien et al., 2015). Pour cela, des tranches d'hippocampe de 50µm d'épaisseur ont été sectionnées à partir de cerveau de rats adolescents, ayant subi le même protocole d'injection déjà décrit, fixés au paraformaldéhyde. Les tranches sont ensuite rincées dans une solution tampon de PBS (Phosphate Buffered Saline) contenant PBS 1X (ref : 8461.0005, ChemSolute), 0.2% Triton ; pH = 7.4. Elles ont été par la suite incubées pendant 15min dans une solution de méthanol et de peroxyde d'hydrogène pour inhiber les peroxydases endogènes et rincées de nouveau dans du PBS. Les tranches d'hippocampe ont été incubées pendant 24h à 4°C, dans une solution de blocage (PBS 1X, BSA 0.1%, TritonX100 0.2% et du sérum de chèvre 2% ; Biowest)) contenant les anticorps primaires puis rincées dans du PBS et incubées avec les anticorps secondaires (tableau 7).

	<i>Anticorps I</i>	<i>Dilution</i>	<i>Anticorps II</i>	<i>Dilution</i>
Ac-H3	Anti ac-H3 (lys9) chez le lapin	1 : 1000	Anti-IgG biotinylé de lapin produit chez le cheval (Kit universel (ref : Pk-6200 Vector laboratories))	1 : 250
Ac-H4	Anti ac-H4 (Lys12) chez le lapin	1 : 7500	Anti-IgG biotinylé de lapin produit chez la chèvre	1 : 2000
HDAC2	Anti-HDAC2 chez le lapin	1 : 500	Anti-IgG biotinylé de lapin produit chez le cheval (ref : Pk-6200 Vector laboratories)	1 : 250

Tableau 7: Anticorps primaires et secondaires utilisées pour le marquage immunohistochimique

V. Tests statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour l'analyse statistique de la PLT et de la DLT et pour les courbes I/O, nous avons utilisé un test d'ANOVA mesures répétées. Nous avons utilisé ce même test pour comparer les niveaux de consommation et de préférence d'éthanol chez les souris KO HSF2 par rapport au WT. Afin de comparer l'effet des antagonistes GluN2A et GluN2B sur le PPSE-NMDA chez les différents groupes, un test t de Student a été utilisé. Pour tous les tests, nous avons choisis une valeur de $p < 0.05$ comme limite de significativité. Concernant les expériences de reconnaissances de nouvel objet, une ANOVA à une voie a permis de comparer les résultats de la capacité d'apprentissage chez les différents groupes.

Résultats

Memory impairment in adolescent rat after binge drinking: HDAC2 modulates GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits in the hippocampus

Résumé en français

Il est bien établi que la molécule d'éthanol (EtOH) induit des troubles cognitifs, comme par exemple la mémoire, en altérant la plasticité synaptique, base de la mémoire et des apprentissages, dans l'hippocampe. Cependant les mécanismes cellulaires sous-tendant ces altérations demeurent mal compris. Une des hypothèses qui pourrait expliquer les altérations de la plasticité synaptique suite à l'exposition à l'éthanol est les modifications touchant particulièrement l'épigénome. Une étude antérieure issue de notre équipe a montré que chez un modèle de binge drinking obtenu par deux injections, en intrapéritonéale, d'EtOH à raison de 3g/kg séparées de 9h d'intervalle chez des rats mâles Sprague Dawley jeunes adultes abolie la DLT enregistrée sur des tranches d'hippocampe dorsal 48 heures après l'administration d'EtOH. Cette abolition est accompagnée d'une augmentation du signal GluN2B du récepteur NMDA et d'un échec d'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet (Silvestre de Ferron et al., 2015). Pour cette étude, nous avons évalué l'hypothèse de modifications épigénétiques qui sont à la base de ces modifications du signal GluN2B et GluN2A du récepteur NMDA. Pour cela, nous avons utilisé des rats Sprague Dawley âgés de 42 à 55 jours ayant reçu, ou non, une injection de sodium butyrate (NaB; 600mg/kg; i.p) 30 minutes avant chaque injection d'éthanol décrites précédemment. Nous avons évalué la capacité d'apprentissage de ces animaux grâce à un test de reconnaissance de nouvel objet et nous avons enregistré les phénomènes de plasticité synaptique de type DLT et PLT sur des tranches de CA1 d'hippocampe dorsal en utilisant la technique d'enregistrement de potentiel de champs. Nous avons aussi examiné les modifications des signaux GluN2A et GluN2B à l'aide d'outils pharmacologiques. L'activité HDAC, les modifications de HDAC2, de ac-H3K9 et ac-H4K12 ont été mesurées par des techniques de RT-qPCR, westernblot et immunohistochimie. Nos résultats montrent que l'abolition de la DLT est associée à une augmentation de l'activité

HDAC, de la quantité d'ARNm et de la protéine de HDAC2 et une diminution de ac-H4K12. Les manipulations pharmacologiques ont montré que la balance GluN2A/GluN2B est affectée suite à l'exposition à l'EtOH ce qui pourrait expliquer les altérations de la DLT observées aussi lors de cette étude. De manière intéressante, l'administration de NaB précédant les injections d'EtOH prévient les modifications de la balance GluN2A/GluN2B, l'abolition de la DLT mais aussi l'échec d'apprentissage lors du test comportemental. En conclusion, les modifications touchant la balance GluN2A/GluN2B après exposition à l'EtOH seraient à l'origine, au moins en partie, des perturbations de la plasticité synaptique et des troubles d'apprentissage et ce en impliquant des mécanismes épigénétiques.

Mots clés: EtOH, HDAC, hippocampe, dépression à long terme.

Cet article a été soumis dans le journal "addiction biology"

**Memory impairment in adolescent rat after binge drinking: HDAC2 modulates GluN2A and
GluN2B NMDA receptor subunits in the hippocampus**

Drissi I., Deschamps C., Alary R., Fouquet G., S. Peineau, Gosset P., Sueur H., Marcq I.,
Debuysscher V., Naassila M., Vilpoux C*., Pierrefiche O.*
UPJV, INSERM UMR 1247 GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les
Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS). Chemin du Thil,
80025 Amiens cedex 1, France.

* : Co-last authors

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

80025 Amiens

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

Fax: (0033) (0)3-22-82-76-72

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

Number of words in abstract: 291

Number of words in the main text: 6591

Number of figures: 6

Number of table: 0

Supplemental information: material and methods and 2 figures

D.I, C.D, A.R performed and analyzed electrophysiology and behavior experiments; F.G., I.M and V.D performed and analyzed cellular biology; G.P., S.H. and C.V. performed and analyzed immunohistochemistry; S.P., M.N., C.V. and O.P. wrote and edited the manuscript.

Abstract

Ethanol (EtOH) induces cognitive impairment through modulation of synaptic plasticity notably in the hippocampus. The cellular mechanism(s) of these effects of EtOH remains unclear and may range from synaptic signaling modulation to alterations of the epigenome. Previously, we reported that two binge-drinking like exposures to EtOH (3g/kg, i.p., 9 h apart) in adolescent rats abolished LTD in hippocampus slices, induced learning deficits and increased NMDA receptor signaling through its GluN2B subunit after 48 h. Here, we tested the hypothesis of EtOH-induced epigenetic alterations leading to modulation of GluN2B and GluN2A NMDA receptor subunits. 42 days old rats were treated with EtOH or the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB, 600 mg/kg, i.p.) injected alone or 30 min before EtOH. After 48 h, learning was tested with novel object recognition while synaptic plasticity and the role of GluN2A and GluN2B subunits in NMDA-fEPSP were measured in CA1 field of hippocampus slices. HDAC activity and changes in HDAC2 as well as in Ac-H3K9 and Ac-H4K14 were measured using RT-qPCR, western-blot or immunohistochemistry. LTD and memory impairments induced by EtOH were associated in the hippocampus with an increase in HDAC activity, HDAC2 mRNA and protein levels while Ac-H4K12 level decreased. The pharmacological manipulation of NMDA-fEPSP unraveled changes in the GluN2A/GluN2B balance. Interestingly, NaB pretreatment prevented all the cellular and memory-impairing effects of EtOH. In conclusion, the memory-impairing effects of two binge drinking-like EtOH exposure involve deficits in NMDA receptor-dependent LTD through changes of the GluN2A/GluN2B balance due to epigenetic mechanisms.

Key words: Ethanol, Long-term depression, epigenetic

Introduction

For more than a decade, the effects of drugs of abuse in the central nervous system have been shown to involve epigenetic changes either on histones or DNA (Walker et al., 2015, Brown and Feng, 2017). Concerning ethanol for example, a study showed in 2004 that chronic ethanol exposure increases expression of the GluN2B NMDA receptor subunit in cortical neurons through DNA demethylation (Marutha Ravindran and Ticku, 2004). Such epigenetic changes induced by EtOH have also been described during neurodevelopment, adolescence and in the development of EtOH addiction. Specifically, epigenetic changes have been reported in fetal alcohol spectrum disorder linking the genome, the environmental conditions and the neurodevelopmental outcomes (Lussier et al., 2017) but also ensuring the transmission of EtOH-related pathologies across generations (Chastain and Sarkar, 2017). Ethanol-induced epigenetic modifications have also been implicated in the acute effects of EtOH in cerebral cortex (Finegersh and Homanics, 2014) or in chronic EtOH exposure during adult life or following intermittent sub-chronic EtOH exposure during adolescence (Crews et al., 2016, Kyzar et al., 2016, Sakharkar et al., 2016, Palmisano and Pandey, 2017). For instance, adolescent intermittent EtOH exposure in rats increased whole hippocampus histone deacetylase (HDAC) activity associated with a decrease in histone H3 acetylation level at adult age, leading possibly to decrease in BDNF expression (Sakharkar et al., 2016). In rat hippocampal-entorhinal cortex brain slice cultures, EtOH exposure

for 96 h decreases HDAC1/4 activity (Zou and Crews, 2014).

At behavioral level our laboratory showed that EtOH-induced sensitization in mice was accompanied with a reduction in striatal HDAC activity and an increase in H4 acetylation level in the core of nucleus accumbens (Botia et al., 2012). Interestingly, the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB) targeting HDAC I and II family classes, prevented or reversed EtOH-induced behavioral sensitization potentially through specific gene regulations in both the striatum and the prefrontal cortex (Legastelois et al., 2013). Furthermore, NaB treatment reduced motivation to drink EtOH and EtOH consumption in the post-dependent state model of EtOH addiction in rats (Simon-O'Brien et al., 2015). Animal treatment with MS-275, an HDACi targeting class I HDAC, reduced motivation to consume EtOH and relapse in heavy drinking rats (Jeanblanc et al., 2015) and reduced binge-like EtOH drinking in mice (Warnault et al., 2013), revealing that modulation of epigenetic processes with HDACi is capable to decrease EtOH addiction-related phenotype. In this context, it has been finally proposed that targeting epigenetic processes that modulate synaptic plasticity may indeed yield to novel treatments for EtOH addiction (Kyzar and Pandey, 2015, Kyzar et al., 2016, Bourguet et al., 2018). Interestingly, among the 18 isoforms of HDAC, the HDAC2 isoform seems to be particularly implicated in the effects of ethanol as mice knockdown for HDAC2 in the amygdala, showed less anxiety-like

behavior and less voluntary EtOH drinking (Moonat et al., 2013).

Epigenetic modulations are not implicated only in pathologies such as EtOH addiction but they also participate to physiological regulations, in particular during learning and memory processes (Levenson et al., 2004, Jarome and Lubin, 2014, Schmauss, 2017). Memory consolidation is known to require protein synthesis. Indeed, gene expression is controlled by cofactors associated with transcription factors and repressors through interaction with transcription machinery, chromatin remodeling and/or chemically modified histones. Hence, histone acetylation by histone acetyltransferase (HAT) has been suggested a key mechanism in memory consolidation (Bousiges et al., 2010, Federman et al., 2014) but also in memory reconsolidation, being involved in retrieval-dependent memory updating through the regulation of specific molecular and cellular processes (Jarome and Lubin, 2014). Neonatal exposure to isoflurane for example, induces long-term memory impairment in mice due to dysregulated histone acetylation in the hippocampus that can be attenuated by the HDACi trichostatin A (Zhong et al., 2015). Inhibiting HDAC increased long-term potentiation (LTP) one of the neuronal synaptic plasticity signals linked to learning and memory processes at cellular level in the hippocampus (Levenson et al., 2004) while learning performance in novel object recognition test (NOR), an hippocampus-

dependent task is ameliorated (Stefanko et al., 2009). Other types of learning are also increased after inhibition of HDAC such as inhibitory avoidance in relation with the amygdala (Valiati et al., 2017).

Binge drinking, a pattern of drinking leading to intoxication in a single short session, is a serious but preventable public health problem (Rolland and Naassila, 2017). It is the dominant type of alcohol misuse in adolescents and is associated with memory and cognitive impairments in both humans and animals (Silvestre de Ferron et al., 2015, Smith et al., 2017). However, whether epigenetic mechanisms are involved in the memory-impairing effects of binge drinking remains unclear. In this context, we recently reported that only two exposures to EtOH (3 g/kg, i.p., 9 h apart, 2g/L blood EtOH content) specifically reduced long-term synaptic depression (LTD), the other synaptic plasticity signal related to learning and memory in hippocampus slices of adolescent rats after 48 h (Silvestre de Ferron et al., 2015). However, the mechanism(s) by which LTD is impaired after binge drinking-like exposure is not established although a first attempt was made since we demonstrated a concomitant increase in the involvement of the NMDA-receptor subunit GluN2B to the NMDA field EPSPs in the hippocampus. According to the literature, epigenetic appears as a good candidate in explaining the 48 h delayed effects of EtOH on synaptic plasticity. Therefore, in the present study we tested the hypothesis that epigenetic mechanisms may play a role in the plasticity and memory-impairing effects of two EtOH binge drinking-like

episodes. We evaluated the effects of the HDACi NaB to prevent the effects of the two EtOH exposures on synaptic plasticity using electrophysiology on acute hippocampus slices, on learning performances with NOR, and on HDAC activity, HDAC2 protein and mRNA levels, and histone acetylation (Ac-H3K9 and Ac-H4K14) with immunohistochemistry, qPCR and western-blotting methods. To further define the mechanisms by which EtOH and epigenetics may alter LTD, we analyzed the sensitivity of NMDA-fEPSPs to GluN2A and to GluN2B subunit antagonists.

Material and methods

Experiments were performed following the European Community guiding principles for the care and use of animals (2010/63/UE, CE Off. J. 20 October 2010), the French decree n° 2013-118 (French Republic Off. J., 2013) and the local institution ethics committee rules (CREMEAP, University of Picardie Jules Verne).

Drugs

Ethanol (VWR, Strasbourg, France) was diluted in saline (0.9 % NaCl) at 15% (v/v) final concentration and intraperitoneally (i.p.) injected. NaB, sodium butyrate (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in saline and administered i.p. at 600 mg/kg (Simon-O'Brien et al., 2015), alone or 30 min before ethanol injections. Trichostatin A (TSA) from Hellobio (UK) was prepared in PBS (20 % DMSO) as stock solution, diluted

at final dose in saline (2 mg/kg; (Pandey et al., 2008)) and then i.p. injected.

Ethanol and NaB exposure

All experiments were performed on male Sprague Dawley rats during late adolescent period (42-55 days; (Schneider, 2013)). The timeline of experiments is illustrated on figure 1. Animals received one of the following treatment: i) NaCl group: two i.p. injections of saline administered 9 h apart with each injection being preceded by 30 min with one i.p. injection of saline ii) EtOH group: two i.p. injections of EtOH (3 g/kg; 15 % v/v; (Silvestre de Ferron et al., 2015)) administered 9 h apart with each injection being preceded by 30 min with one i.p. injection of saline iii) NaB group: two i.p. injections of saline administered 9 h apart with each injection being preceded by 30 min with one i.p. injection of NaB (600 mg/kg) and iv) EtOH + NaB group : two i.p. injections of ethanol (3 g/kg) administered 9 h apart with each injection being preceded by 30 min with one i.p. injection of NaB (600 mg/kg). All measurements were performed after 48 h delay.

Slices and electrophysiology

Slices and electrophysiology data were obtained as previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). Briefly, after halothane anaesthesia and decapitation the brain was immersed in artificial cerebrospinal fluid (aCSF, 4°C), and serially cut with a vibratome (Leica VT1000E, Rueil-Malmaison, France) to obtain 400 µm thick slices from dorsal hippocampi, that were stored (> 60 min) in

carbogen (95% O₂/5% CO₂; pH 7.2-7.4; 28°C) gassed aCSF of the following composition (mM): NaCl 125, KCl 3, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 2.3, MgCl₂ 1.3, NaHCO₃ 25, glucose 10. Recorded slices were transferred to a recording chamber perfused at a rate of 6 ml/min. A bipolar stimulating electrode (Phymep, Paris, France) was placed on the Schaffer collateral and used at 0.033 Hz frequency (square pulse, 100 μs duration) for LTD experiments and 0.1 Hz for LTP. Field potential responses (either population spike or fEPSPs) were collected with 3M NaCl (1-3 MΩ) filled glass microelectrodes into the pyramidal cell body layer of CA1 or in the *stratum radiatum*. For each slice an input/output relationship was performed to determine the maximal response from which test stimulus strength was set to 50 %-60 % of this maximum. Signals were amplified (Grass amplifier, x1000-2000), filtered (1-3 KHz) and recorded on computer with Signal software (CED, Cambridge, UK) for off-line analysis. To induce LTD, we used a train of pair of pulses separated by 200 ms and delivered 900 times at 1 Hz of (pLFS200-900, ([Kemp et al., 2000](#))). LTP was induced with 2 x 1 s duration stimulation at 20 Hz, separated by 10 s. Plasticity was recorded for 60 min. NMDA-fEPSPs were pharmacologically isolated (zero-Mg²⁺ aCSF + 50 μM bicuculline + 10 μM CNQX, to block GABA-A and AMPA receptors, respectively) and 5 μM Ro 25-6981 antagonist was used to test the role of GluN2B subunit and 20 nM NVP-AAM077 antagonist for GluN2A subunit ([Fischer et al., 1997](#), [Bartlett et al., 2007](#)). At the end of recording, 20 μM AP-5 was added. Results are expressed as percent

change relative to baseline value of the population spike amplitude or the EPSPs slope. Drugs were applied sequentially and alternatively from one recording to another. Only slices demonstrating 10-15 min of stable baseline recording were used and measurements were averaged every minute. For electrophysiology, “n” is the number of slices tested. Average raw traces either for population spike or EPSPs were made from 30 to 60 sweeps.

Western Blot Experiments

Ten rats were randomly assigned to control (NaCl, n = 5) or EtOH group (n = 5). Cytoplasmic proteins of isolated CA1 of hippocampus were extracted with Nonidet P40 (NP40) buffer (1% NP40, 50 mM Tris pH 7.5, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Na₃VO₆, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml leupeptin and 2 mg/ml pepstatin) containing protease and phosphatase inhibitors. Nuclear proteins were extracted with NP40 containing protease and phosphatase inhibitors and 1% TritonX100 (Sigma Aldrich). Equal amounts of each protein sample were separated by electrophoresis on SDS-PAGE, blotted onto nitro-cellulose membranes (Bio-Rad, Munich, Germany) and blotted with antibodies against HDAC2 (ab32117, abcam), and GAPDH (#2118, Cell Signaling Technology). Blots were developed with the Clarity™ chemiluminescence (ECL) system (BioRad).

HDAC activity assay

Ten rats were randomly assigned to control (NaCl, n = 5) or EtOH group (n = 5). HDAC activity was measured in whole hippocampus using the luminescent HDAC-Glo™ I/II Assay and Screening System (Promega). One µg of nuclear proteins of hippocampus extracts were diluted in 100 µL of the HDAC-Glo™ I/II Buffer in a 96-well white-walled LUMITRAC™ plate. After adding HDAC-Glo™ I/II Reagent, luminescence was measured on a microplate reader (Tecan, Switzerland) every 90 seconds and quantification was performed after 20 min, i.e., at maximum luminescence intensity. Experiment was performed in triplicates.

RNA extraction and quantitative real time PCR

Total RNA of isolated CA1 was extracted using Maxwell®RSC Simply RNA Tissue (Promega, Charbonnières-les-bains, France) and 5µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA with multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). Quantitative PCR was performed according to the GoTaq® RT-qPCR Systems protocol (Promega) using the following primers: HDAC2 For 5'-GGCCTCAGGATTCTGCTACG-3' Rev 5'- GACGGTCATCACGCGATCT -3' and GAPDH For 5'- GTTCAACGGCACAGTCAAGG -3' Rev 5'- CGACATACTCAGCACCAGCA -3'

Immunohistochemical labelling of acetylated H3 and H4 (Ac-H3, Ac-H4) and HDAC2

Forty-two days-old rats (n = 40) were randomly assigned to the NaCl, EtOH, NaB and EtOH + NaB groups and anesthetized with pentobarbital (60 mg / kg i.p.) plus heparine (2 500 UI, i.p.). Vascular bed was flushed via the ascending aorta with 75 ml of heparinized 0.9% saline and 200 ml of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (T° 4°C, PBS, pH 7.4). Brains were removed, postfixed in 4% PFA overnight and placed into a 30 % sucrose cryoprotection solution for a week. Fifty µm frozen coronal sections of dorsal hippocampus (Bregma -2.80mm to Bregma -3.60mm) were obtained with a cryostat and put in cryoprotective solution (ethylene glycol 30 %; Sucrose 30 %, NaCl 0.9 %, in PBS 1x) and stored at -20°C. Floating sections were immunostained for Ac-H3K9, Ac-H4K12 and HDAC2 as previously described ([Simon-O'Brien et al., 2015](#)). Slides were rinsed in PBST (PBS 1x (ref 8461.0005, ChemSolute), 0.2% Triton, pH 7.4) and incubated (15 min) with 3% hydrogen peroxide in methanol to quench endogenous peroxidases and then rinsed in PBST. Incubation for 24 hours at 4°C in a blocking solution (PBS 1x, BSA 0.1 %, TritonX100 0.2 %, Goat serum 2 % (Biowest)) followed with respectively, a rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys 9) antibody (Upstate, Lake Placid, NY, USA) diluted (1/1000); a rabbit monoclonal anti-acetyl-histone H4 (Lys12) antibody (Millipore), diluted (1/7500); a rabbit monoclonal anti-HDAC2 antibody diluted (1/500) (ab 32117, Abcam). For HDAC2 labelling, heat-mediated antigen unmasking was performed in sodium citrate buffer (sodium citrate 10 mM, Tween20, 0.05 %, pH 6) for 3X30 seconds in

microwave before first antibody incubation. Slides were rinsed in PBST and processed for Ac-H3, HDAC2 (Vectastain ABC Elite kit; SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Ac-H4 labellings with biotin conjugated goat anti-rabbit secondary antibody 1/2000 (111-065-144 Jackson ImmunoResearch). Immunolabeling was computerized through Mercator® (Explora Nova, France) image analysis system. All images were acquired using the same light level by using a 20× objective lens, and analyzed by a 'blind' experimenter. A basal threshold was established and applied to all images. Subsequently, the grayscale digital image was classified into positive staining areas and background. Cells with immunoreactivity above this threshold were counted as immuno-positive cells. Immuno-positive cells were counted and normalized in areas of 100 000 μm^2 .

Novel object recognition test (NOR)

NOR was previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). Forty-two days-old animals ($n = 40$) were allowed to acclimate to the animal care facility, handled twice a day and randomly assigned to one of the following groups: NaCl, EtOH, NaB and EtOH + NaB ($n = 10$ animals per group). Learning phase took place 48 h after the first injection. Rats were transferred to the test room 30 min before the experiment. The apparatus was a square box with an open top, made of opaque Plexiglas (45 x 45 x 45 cm) and under a 30 lux illumination. The objects were different enough in shape to be distinguished and were too heavy to be

displaced by rats and located at the same distance from the wall. After a 10 min habituation, animals were submitted to a 10 min learning phase with two objects. Test phase was performed 48 h later by replacing one object by a new one. Digital video acquisition system (Pinnacle Studio HD v.15 software) was used. We measured the total exploring time spent on the objects during the first 5 min of recording (sniffing, licking, or touching the objects with forelimbs). Exploration time was normalized and expressed as a percentage of time spent by rat on novel object compared to the familiar object.

Statistics and data presentation

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using SigmaStat® software (LogiLabo, Paris, France). A 2-way Repeated Measure ANOVA was used on raw data for synaptic plasticity and immunohistolabelling experiments. A 2 way ANOVA without repetition was used for EPSPs and NOR experiments. Western-blot, qPCR and enzymatic assay were tested with unpaired Student's t test. *Post hoc* multiple comparisons were conducted using Tukey's test. The data normality was also tested and passed. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Effects of two EtOH exposures on synaptic plasticity and reversal with HDACi

We first measured LTD in the CA1 area of acute hippocampus slice 48 h after treatment as previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). Concerning LTD, the 2-way ANOVA revealed an effect of the EtOH factor ($F_{(1,26)} = 16.11$, $p < 0.001$), no effect of the NaB factor ($F_{(1,26)} = 3.0$, $p = 0.096$), and no significant interaction between factors ($F_{(1,24)} = 1.44$; $p = 0.242$). *Post hoc* analyses showed a significant decrease of LTD after EtOH. Control group showed a LTD of $-40.9 \pm 5.5\%$ of baseline whereas LTD was $-18.1 \pm 3.6\%$ ($p = 0.001$ between groups) after EtOH. Thus, as reported in our previous study, LTD was strongly reduced after 48 h (Fig 2A). NaB alone had no effects on LTD since values were not significantly different from the control group (NaCl: $-40.9 \pm 5.5\%$ vs NaB: $-43.2 \pm 5.8\%$, $p = 0.72$, Fig. 2B). However, NaB injected as a pretreatment before EtOH prevented significantly the EtOH-induced LTD reduction (Fig. 2C). Indeed, LTD magnitude after NaB + EtOH and after EtOH alone reached respectively $-31.0 \pm 2.3\%$ vs $-18.1 \pm 3.6\%$ ($p < 0.042$). In addition, LTD magnitude after EtOH + NaB was not significantly different from NaCl level ($-31.0 \pm 2.3\%$ vs $-40.9 \pm 5.5\%$, respectively, $p = 0.06$, Fig. 2G). In summary, NaB significantly prevented the effects of EtOH on LTD magnitude without being effective when given alone. Similar results were obtained when Trichostatin A (TSA) was used instead of NaB (see supplementary data).

Concerning LTP, 2-way ANOVA revealed an effect of the EtOH factor ($F_{(1,20)} = 10.117$, $p = 0.005$), no effect of the NaB factor ($F_{(1,20)} = 3.979$, $p = 0.061$) and no significant interaction between factors ($F_{(1,18)} = 0.164$; $p = 0.69$). *Post hoc* analyses showed that EtOH alone increased significantly LTP magnitude (Fig. 2D, H) as already described (Silvestre de Ferron et al., 2015). Thus, LTP magnitude reached $10.6 \pm 4.2\%$ for NaCl group vs $26.0 \pm 4.8\%$ for the EtOH group ($p = 0.013$, Fig. 2D, H). NaB alone had no effect on LTP as compared to control group (NaB, $3.7 \pm 1.6\%$ vs NaCl, $10.6 \pm 4.2\%$, $p = 0.3$, Fig. 2E, H). When animals were treated with NaB + EtOH, LTP magnitude was not significantly altered as compared to EtOH alone (EtOH + NaB, $15.7 \pm 4.0\%$ vs EtOH, $26.0 \pm 4.8\%$, $p = 0.09$, Fig. 2F, H). In summary, the increased in LTP magnitude observed after EtOH was not prevented by NaB, and NaB alone was not effective.

Sensitivity of NMDA-fEPSPs to GluN2A and GluN2B antagonists

Previously, we reported that NMDA-fEPSP become more sensitive to GluN2B antagonist 48 h after EtOH. Here, we checked whether NaB prevented this effect and we extended our work to the analysis of the NMDA-fEPSP sensitivity to an antagonist of GluN2A subunit. Regarding the effects of NVP-AAM077, a GluN2A antagonist, 2 way ANOVA revealed an effect of the EtOH factor ($F_{(1,39)} = 7.9$; $p = 0.008$), no effect of the NaB factor ($F_{(1,39)} = 1.7$; $p = 0.205$) and no interaction ($F_{(1,37)} = 1.8$; $p = 0.486$). *Post hoc* test showed that

EtOH treatment reduced significantly NVP-AAM077 effects on NMDA-fEPSPs by 61.3 ± 25.1 % (from -22.7 ± 3.2 % in control slices to -8.8 ± 2.3 % after EtOH, $p = 0.007$, Fig. 3A). After NaB alone, the percent of inhibition by NVP-AAM077 was similar to that measured in control slices (NaB: -22.5 ± 3.2 vs NaCl: -22.7 ± 3.2 %, $p = 0.97$, Fig. 3A). Finally, pretreatment with NaB before EtOH showed a significant prevention of EtOH effects (EtOH: -8.8 ± 2.3 % vs EtOH + NaB: -17.6 ± 2.8 %, $p = 0.05$). Thus, after NaB + EtOH the correction brought by NaB was of 100 % (from -8.8 ± 2.3 % to -17.6 ± 2.8 %).

When the GluN2B antagonist Ro-25 6981 was tested on NMDA-fEPSP, 2 way ANOVA revealed an effect of the factor EtOH ($F_{(1,39)} = 14.9$, $p < 0.001$), no effect of the NaB factor ($F_{(1,39)} = 3.2$, $p = 0.08$) and an interaction ($F_{(1,37)} = 9.9$, $p = 0.003$). In contrast to NVP-AAM077, the treatment with EtOH increased the sensitivity to Ro-25 6981 by 259.1 ± 57.1 % (from -9.6 ± 3.7 % in control slices to -34.4 ± 3.5 % after EtOH; $p < 0.001$, Fig. 3B). Similarly to NVP-AAM077, the treatment with NaB alone had no effect on the sensitivity to GluN2B antagonist (NaB: -14.4 ± 3.9 % vs Control: -9.6 ± 3.7 %, $p = 0.378$, Fig. 3B) and finally, pretreatment with NaB before EtOH prevented significantly the effects of EtOH alone (NaB + EtOH: -17 ± 2.9 % vs EtOH: -34.4 ± 3.5 %, $p < 0.001$, Fig. 3B). Indeed, the effects of Ro-25 6981 after EtOH + NaB reached 176.6 ± 31.3 % of its effect in the NaCl conditions, revealing a correction of EtOH effects by 51 % (from -34.4 ± 3.5 % to -17 ± 2.9 %). In summary, NMDA-fEPSP become less sensitive to GluN2A

antagonist and more sensitive to GluN2B antagonist after EtOH and NaB prevents significantly these effects of EtOH while NaB alone had no effects.

Furthermore, the input/output curve for NMDA-fEPSP was shifted leftward 48 h after EtOH whereas after NaB + EtOH, the curve resumed to control level (Fig. 3C) whereas the input/output curve for NaB alone was similar to that of NaCl (Fig. 3C). Finally, the Bernstein-Cooper-Munroe theoretical curve established in our experimental conditions showed that after EtOH the threshold to induce LTD was shifted to the left as compared to NaCl whereas after NaB + EtOH it was shifted back to the right, towards the control curve (Fig. 3D).

Effects of HDACi on the memory-impairing effect of EtOH

We next tested the effects of NaB on learning task that we showed previously to be impaired after the two binge-like exposures ([Silvestre de Ferron et al., 2015](#)). Thus, NOR was performed in the four groups of animals following the time line depicted on Fig. 1. During training phase and in presence of the two objects A and B, all animals spent 50 % of their exploratory time on each object (Fig. 4A), revealing no spontaneous preference. Object A was explored for 47.9 ± 1.3 % of the total exploratory time and object B was explored for 52.1 ± 1.3 % of the total time ($p > 0.05$ between groups).

During test phase (Fig. 4B), 2 way ANOVA revealed an effect of the NaB factor ($F_{(1,37)} = 8.952$, $p = 0.005$), an effect of the

EtOH factor ($F_{(1,37)} = 14.822$, $p < 0.001$) and a significant interaction between factors ($F_{(1,35)} = 15.209$; $p < 0.001$). *Post hoc* analysis showed that in the group treated with EtOH (Fig. 4C), animals spent significantly less time exploring the novel object C than NaCl treated animals (EtOH, 38.0 ± 3.14 % vs NaCl, 61.3 ± 3.2 %, $p < 0.001$). Importantly, rats treated with EtOH + NaB spent significantly more time on the novel object than animals treated with EtOH alone (EtOH + NaB, 58.75 ± 3.2 % vs EtOH, 38.0 ± 3.14 %, $p < 0.001$), but similar time than that spent by the NaCl group (EtOH + NaB, 58.75 ± 3.2 % vs NaCl, 61.3 ± 3.2 %, $p = 0.8$). Finally, NaB alone had no effect on learning performance since there was no difference between the NaCl group and the NaB group (NaCl, 61.3 ± 3.2 % vs 58.6 ± 2.45 %, $p = 0.243$, Fig. 4C).

Epigenetic changes and the effects of HDACi

Both electrophysiology and behavioral data suggest that two EtOH intoxications trigger epigenetic modifications after 48 h, at a time when LTD and cognition deficits were detected. Thus, in a first set of experiment, we measured enzymatic activity for the HDAC I/II classes and HDAC2 protein and mRNA levels in NaCl versus EtOH groups (Fig. 5) 48 h after the two EtOH exposures. The results showed that enzymatic HDAC I/II classes activity in whole hippocampus homogenates was enhanced after EtOH (Fig. 5A; NaCl: 28894.6 ± 4909.1 vs EtOH 36290.3 ± 3997.9 , $p < 0.05$) while HDAC2

mRNAs (NaCl, 4.5 ± 0.76 vs EtOH, 5.6 ± 0.96 , $p < 0.05$, Fig. 5B) and HDAC2 protein levels (isoform from the HDAC I family), were increased after EtOH in isolated CA1 area (NaCl, 0.1 ± 0.22 vs EtOH, 1.4 ± 1.1 , $p = 0.05$, Fig. 5C). To go further on epigenetic changes, we measured the number of HDAC2 immunolabelled cells as well as staining for acetylated-H3 (Ac-H3K9) and -H4 (Ac-H4K12) in CA1 area in the different treated groups (Fig. 6). Concerning the Ac-H4K12 immunolabelling (Fig. 6A), in the CA1 region, the 2 way ANOVA revealed an effect of the NaB factor ($F_{(1,30)}=5.599$, $p = 0.025$), no effect of the EtOH factor ($F_{(1,30)} = 1.888$, $p = 0.18$) and no significant interaction between both factors ($F_{(1,28)} = 2.802$; $p = 0.105$). *Post hoc* analyses showed that EtOH exposure induced a significant decrease of Ac-H4K12 immunolabelling in CA1 (NaCl, 1279.2 ± 34.8 vs EtOH, 111.1 ± 22.4 , $p = 0.034$) and that NaB alone was devoid of specific effect on Ac-H4 immunolabelling (NaCl, 1279.2 ± 34.8 vs NaB, 1317.4 ± 63.0 , $p = 0.617$). However, NaB injected as a pre-treatment before EtOH prevented the EtOH-induced Ac-H4K12 expression decrease in a significant manner (EtOH, 111.1 ± 22.4 , vs EtOH + NaB, 1317.4 ± 63.0 , $p = 0.010$). Ac-H3K9 labelling was unaltered 48 h after the two EtOH exposures (see additional figure 2). Concerning HDAC2, in CA1, the 2-way ANOVA revealed an effect of the NaB factor ($F_{(1,27)} = 13.696$, $p = 0.001$), no effect of the EtOH factor ($F_{(1,27)} = 1.49$, $p = 0.234$) and a significant interaction between factors ($F_{(1,25)} = 10.362$, $p = 0.004$). *Post hoc* analyses showed that EtOH exposure induced a significant increase of HDAC2 immunolabelling in CA1 (NaCl, 998.1 ± 52.2

vs EtOH, 1228.9 ± 58.2 , $p < 0.01$; Fig. 6B). NaB alone had no effect ($p = 0.747$). Again, NaB injected as a pre-treatment before binge drinking-like EtOH exposure prevented the EtOH-induced HDAC2 expression increase in a significant manner in CA1 (EtOH, 1228.9 ± 58.2 vs EtOH + NaB, 869.2 ± 57.0 , $p < 0.001$).

Discussion

This study confirms and extends our previous work demonstrating that 48 h after two binge drinking-like EtOH episodes, LTD - a major form of synaptic plasticity related to learning and memory processes ([Collingridge et al., 2010](#)) - is significantly reduced in the hippocampus of adolescent rats, leading to learning deficit. Here, we demonstrated that two binge-like EtOH exposures modulate the involvement of both GluN2A and GluN2B subunits of the NMDA receptors in synaptic transmission resulting in an increase in network intrinsic excitability and changes in synaptic plasticity. We further showed EtOH-induced epigenetic alterations consisting in an upregulation of HDAC2 level and HDAC activity in the hippocampus with a parallel decrease in the level of Ac-H4, concomitant to LTD abolition and learning deficit. Correspondingly, treatment with an HDACi prevented the effects of EtOH on LTD, on learning performance, on the increased expression of HDAC2 as well as on the decrease in Ac-H4 levels in the hippocampus. Therefore, our results suggest that two episodes of EtOH intoxication in adolescent rat disturbed synaptic plasticity in the hippocampus leading to cognitive deficits

through the modulation of both GluN2A and GluN2B subunits of the NMDA receptor possibly through EtOH-induced epigenetic changes.

Alterations in epigenetic processes after 2 binge-like ethanol exposures

The level of Ac-H4K12 was significantly decreased in CA1 area of the hippocampus whereas the level of Ac-H3K9 was unchanged 48 h after the two EtOH exposures. Importantly, expression level of HDAC2, the enzyme that deacetylates histone 4, as well as HDAC2 mRNA level and enzymatic activity of HDAC I/II classes were concomitantly increased. Altogether, these data revealed that the K12 site of histone 4 is regulated by EtOH as compared to the K9 site of histone 3 and that the decrease in Ac-H4K12 is probably related to the increase in expression level and enzymatic activity of HDAC2 in CA1. This later assumption is supported by previous results obtained in HDAC2 knockout mice displaying an increase in Ac-H4K12 and Ac-H4K5 levels but not in Ac-H3K14 level ([Guan et al., 2009](#)). Several previous studies have shown epigenetic changes after EtOH exposure. For example, 6 h following 3 g/kg i.p. EtOH injection in C57BL/6J mice, both Ac-H3K9 and Ac-H4K14 were increased in the hippocampus while expression level of HDAC2 was decreased in the cerebral cortex ([Finegersh and Homanics, 2014](#)). Similarly, in the caudate putamen of mice, 1 h after acute i.p. EtOH (2.5 g/kg) administration, western-blotting showed a reduction levels of class I HDACs 1-3 isoforms, with no

changes in the prefrontal cortex ([Caputi et al., 2015](#)). Thus, shortly after EtOH treatment, HDAC activity is reduced and acetylated forms of histones is augmented. However, our results were obtained 48 h after EtOH intoxication, e.g., in absence of plasmatic EtOH ([Silvestre de Ferron et al., 2015](#)). Fifty days after two weeks of chronic intermittent ethanol (CIE) exposure during adolescence in rat, HDAC activity increases in the whole hippocampus accompanied with a significant decrease in Ac-H3K9 immunolabelling in all areas except the DG ([Sakharkar et al., 2016](#)). In accordance with these data we reported herein an increase in HDAC I/II classes activity with higher HDAC2 expression level, accompanied with a decrease in Ac-H4K12 in CA1 although Ac-H3K9 was unchanged. Indeed, epigenetic modulation appears to be region-dependent, as well as dependent upon HDAC isotypes and histone isoforms. In this context, the difference with other studies may come from the pattern of EtOH exposure, i.e., 2 EtOH exposures vs sub-chronic CIE for two weeks and/or from the time point of measurements (48 h vs 50 days for example). A study performed after 7 days withdrawal from a 10 days binge exposure in C57BL/2J mice, showed that acute EtOH administration reduced HDAC activity and upregulated Ac-H4K12 in the nucleus accumbens proportionally to the decrease of striatal HDAC activity ([Botia et al., 2012](#)). Altogether, these results suggest a sequential change in different epigenetic mechanisms along the duration of EtOH exposure, during withdrawal and at different time points following EtOH exposure revealing a constant and highly dynamic epigenetic regulation. In total, our

study demonstrated that epigenetic regulation of gene expression occurred at short term after only 2 EtOH intoxications in the hippocampus and suggest that such modifications of the epigenome may be related to LTD abolition in CA1 area and thus to cognitive deficits. This assumption is supported by our measurements performed with NaB, an HDACi, injected before EtOH which revealed a significant prevention of EtOH effects on epigenetic modifications. Specifically, the EtOH-induced increase in HDAC2 isoform as well as the decrease in Ac-H4 labelling were both prevented following NaB pre-treatment. Therefore we may propose that induction of HDAC2 by EtOH may participate to the EtOH effects on synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus according to the known role of HDAC in memory processes.

HDAC2 and memory

A large body of work brought evidences that epigenetic changes play a role in memory formation and maintenance, notably in hippocampus-dependent learning tasks including NOR. Our results showed that the memory-impairing effects of EtOH measured in NOR 48 h after EtOH were prevented by NaB. Importantly, NaB had an effect only when co-applied with EtOH since NaB alone was not effective on learning task. It is known that the level of both acetylated histone and HDAC are associated with learning and memory processes. Specifically it was shown that overexpression of HDAC2 induces structural and synaptic plasticity impairment related to low memory performances ([Guan et al., 2009](#)).

Conversely, these authors reversed the observed effects using an HDACi or Hdac2 knockout mice. In addition, high levels of HDAC2 have been associated to memory impairment induced by scopolamine ([Singh et al., 2015](#)) or ageing ([Singh and Thakur, 2018](#)), revealing further the involvement of high HDAC2 in degraded memory processes. HDAC2 however shows a relative selectivity in terms of memory since loss of HDAC2 accelerates extinction rate of fear responses and conditioned taste aversion and enhanced attention performance without impacting episodic memory or motor learning ([Morris et al., 2013](#)). Accordingly, we found an increase in HDAC2 expression 48 h after EtOH binge associated with cognitive deficits in NOR and with loss of LTD. This is in accordance with the literature showing that HDAC2 is an important factor mediating epigenetic blockade of synaptic plasticity involved in learning and memory ([Guan et al., 2009](#), [Graff et al., 2012](#)). Indeed, overexpression of HDAC2 is known for regulating the activity of promoters of genes implicated in synaptic plasticity and memory formation, decreased dendritic spine density, synapse number and synaptic plasticity ([Guan et al., 2009](#)). Interestingly, the use of an HDACi targeting HDCA2 was shown to attenuate remote memory (i.e., month-old), suggesting such pharmacological strategy could be useful to treat long-lasting disturbing memory such as “pathological memory” linked to a history of addiction ([Graff et al., 2014](#)). Importantly in our experimental conditions, LTD was preserved after NaB treatment and this was paralleled by the prevention of cognitive performance in NOR.

Importantly, the same prevention effects on LTD was found with trichostatin A, another HDACi, instead of NaB, revealing that NaB effects are not related to non-specific or potential side effects of the drug. In summary, two binges of EtOH during adolescence in rat induced epigenetic changes in the hippocampus leading to increased HDAC2 isoform associated with synaptic plasticity disturbances and cognitive deficits. However, the link between HDAC2 overexpression and specific lack of LTD is lacking at that point. However, our measurements of NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists with and without NaB may help understanding the relation between HDAC2, EtOH and synaptic plasticity in the hippocampus.

Modulation of GluN2A and GluN2B subunits by EtOH and HDACi

Interestingly, we found that epigenetic modifications by two episodes of EtOH intoxication were accompanied by changes in NMDA-fEPSPs sensitivity to antagonists of the GluN2A and the GluN2B subunits of the NMDA receptor. More precisely, in control animals treated with NaCl, NMDA-fEPSP was more sensitive to GluN2A than to GluN2B antagonist, suggesting albeit indirectly that NMDA synaptic transmission involved more GluN2A than GluN2B containing NMDA receptors. This result could be consistent with the literature indicating a major contribution of GluN2A subunit at adult age than GluN2B subunit in glutamatergic synapses ([Monyer et al., 1994](#)). The results

after EtOH confirmed and extended our previous work ([Silvestre de Ferron et al., 2015](#)) showing an increase of NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2B antagonist by 259 %. This effect was furthermore accompanied with a decrease in the sensitivity to GluN2A antagonist by 61 %. These two observations suggest that GluN2B is particularly sensitive to EtOH modulation and that additionally, EtOH also modulates significantly the sensitivity to a GluN2A antagonist. Finally, our results showed that EtOH modulates preferentially, but not exclusively, the GluN2B subunit of the NMDA receptor. Here again, the use of NaB prevented EtOH-induced alteration in NMDA-fEPSP pharmacological sensitivity, leading to levels of sensitivity closer to what was found in control slices for both subunit antagonists. These findings suggest an involvement of HDAC in ethanol-induced alterations in NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists. In consequence, it could be that EtOH effects on glutamatergic synaptic transmission are expressed via the modulation of the relative contribution of the two NMDA receptor subunits. Therefore, in this context, measuring the sensitivity to antagonists of these two subunits allowed us to express our results in terms of GluN2A-to-GluN2B ratio in the different experimental conditions. Hence, after EtOH the GluN2A-to-GluN2B ratio decreased compared to control whereas after NaB + EtOH this ratio increased towards control level because of the prevention effects of NaB. Importantly, changes in GluN2A-to-GluN2B ratio dictate the capacity of a synapse to perform plasticity according to the theoretical

learning rule established by Bienenstock, Cooper and Munro ([Bienenstock et al., 1982](#), [Paoletti et al., 2013](#)). Our measurements further support the notion that synaptic plasticity in the hippocampus after EtOH and following EtOH + NaB treatment is controlled by metaplasticity rules as demonstrated through the Bienenstock-Cooper-Munro like-curve we established (see fig. 3D and also ([Silvestre de Ferron et al., 2015](#))).

Regarding a link between NMDA-receptor subunits and HDAC activity, it was shown in the hippocampus that overexpression of HDAC2, but not that of HDAC1, was accompanied with lower GluN2A and GluN2B subunits expression levels whereas in contrast, Hdac2 knockout mice showed the opposite ([Guan et al., 2009](#)). Therefore, an increase in HDAC2 activity after EtOH in our experiments may be responsible for a decrease in GluN2A expression, indirectly revealed through a lower sensitivity of NMDA-fEPSP to GluN2A antagonist. However, the case of GluN2B subunit is not as clear as we obtained a higher sensitivity to the antagonist in presence of a high level of HDAC2. Perhaps, this latter result should take into account that changes in NMDA-fEPSP sensitivity to the antagonist after EtOH do not reflect alterations in subunit expression levels but more, or also, a reorganization of GluN2B subunit location between synaptic and perisynaptic compartment. Indeed, GluN2B containing NMDA receptors are highly mobile in the synapse in different conditions ([Groc et al., 2006](#)). Therefore, the increase in HDAC2 levels after two EtOH intoxications cannot explain all of our results. Together with the fact that NaB did not fully restore the

sensitivity of the two antagonists (and also the magnitude of LTD) suggest that another mechanism due to EtOH may have occurred at cellular level in addition to changes in the epigenome.

Although the level of HDAC2 expression is highly associated with structural plasticity in the hippocampus ([Guan et al., 2009](#)), an interaction between HDAC2 and synaptic transmission at cellular level cannot be ruled out. Indeed, HDAC2 overexpression suppresses excitatory synaptic function in a cell-autonomous manner in CA1 pyramidal neurons while enhancing GABA-dependent inhibitory transmission ([Hanson et al., 2013](#)), suggesting that enhancement of inhibitory transmission within the hippocampus could also be responsible for LTD reduction 48 h after EtOH exposure in the present study. Hence, a hypothesis that awaits to be tested is the involvement of GABA inhibition in the blockade of LTD related to the increase in HDAC2 in the hippocampus.

Another interesting result was that NaB tested alone had no effect on NMDA-fEPSPs sensitivity to the two antagonists, paralleled with lack of effect on both learning capability and LTD magnitude. Discrepancies with previous studies reporting a positive effect of NaB on learning tasks and synaptic plasticity may come from the time-point analyzed, the mode of drug injection or the age of the animals. Indeed, LTP was shown to be enhanced with trichostatin A when it was acutely tested (i.e., bath applied) onto the hippocampus slice ([Levenson et al., 2004](#)) obtained, furthermore, from relative young animals (21 days old). Cognitive function that has been shown to be

improved, notably in NOR, was tested 24 h after NaB injection ([Stefanko et al., 2009](#)).

In conclusion, binge drinking-like exposure to EtOH during adolescence in rats induces synaptic plasticity and learning and memory impairments that are mediated through epigenetic mechanisms and modulation of GluN2A and GluN2B subunits of the NMDA receptor in the hippocampus.

Acknowledgments: ID is supported by INSERM and Région Hauts-de-France, GF is supported by the French ministry of Research, SP is holder of a Chair of Excellence “Synaptic plasticity” funded by Région Hauts-de-France.

References

- Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, Dargan SL, Massey PV, Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Collingridge GL, Lodge D (2007) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 52:60-70.
- Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW (1982) Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci* 2:32-48.
- Botia B, Legastelois R, Alaux-Cantin S, Naassila M (2012) Expression of ethanol-induced behavioral sensitization is associated with alteration of chromatin remodeling in mice. *PLoS One* 7:e47527.
- Bourguet E, Ozdarska K, Moroy G, Jeanblanc J, Naassila M (2018) Class I HDAC Inhibitors: Potential New Epigenetic Therapeutics for Alcohol Use Disorder (AUD). *J Med Chem* 61:1745-1766.
- Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler JP,

- Cassel JC, Boutillier AL (2010) Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 35:2521-2537.
- Brown AN, Feng J (2017) Drug Addiction and DNA Modifications. *Adv Exp Med Biol* 978:105-125.
- Caputi FF, Palmisano M, D'Addario C, Candeletti S, Romualdi P (2015) Effects of acute ethanol exposure on class I HDACs family enzymes in wild-type and BDNF(+/-) mice. *Drug Alcohol Depend* 155:68-75.
- Chastain LG, Sarkar DK (2017) Alcohol effects on the epigenome in the germline: Role in the inheritance of alcohol-related pathology. *Alcohol* 60:53-66.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-473.
- Crews FT, Vetreno RP, Broadwater MA, Robinson DL (2016) Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior. *Pharmacol Rev* 68:1074-1109.
- Day JJ, Sweatt JD (2011) Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70:813-829.
- Federman N, Zalcman G, de la Fuente V, Fustinana MS, Romano A (2014) Epigenetic mechanisms and memory strength: a comparative study. *J Physiol Paris* 108:278-285.
- Finegersh A, Homanics GE (2014) Acute ethanol alters multiple histone modifications at model gene promoters in the cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 38:1865-1873.
- Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E, Heitz MP, Kemp JA (1997) 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* 283:1285-1292.
- Graff J, Joseph NF, Horn ME, Samiei A, Meng J, Seo J, Rei D, Bero AW, Phan TX, Wagner F, Holson E, Xu J, Sun J, Neve RL, Mach RH, Haggarty SJ, Tsai LH (2014) Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* 156:261-276.
- Graff J, Rei D, Guan JS, Wang WY, Seo J, Hennig KM, Nieland TJ, Fass DM, Kao PF, Kahn M, Su SC, Samiei A, Joseph N, Haggarty SJ, Delalle I, Tsai LH (2012) An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 483:222-226.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, Choquet D (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18769-18774.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459:55-60.
- Hanson JE, Deng L, Hackos DH, Lo SC, Lauffer BE, Steiner P, Zhou Q (2013) Histone deacetylase 2 cell autonomously suppresses excitatory and enhances inhibitory synaptic function in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 33:5924-5929.
- Jarome TJ, Lubin FD (2014) Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 115:116-127.
- Jeanblanc J, Lemoine S, Jeanblanc V, Alaux-Cantin S, Naassila M (2015) The Class I-Specific HDAC Inhibitor MS-275 Decreases Motivation to Consume Alcohol and Relapse in Heavy Drinking Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- 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. *Eur J Neurosci* 12:360-366.
- Kyzar EJ, Floreani C, Teppen TL, Pandey SC (2016) Adolescent Alcohol Exposure: Burden of Epigenetic Reprogramming, Synaptic Remodeling, and Adult Psychopathology. *Front Neurosci* 10:222.
- Kyzar EJ, Pandey SC (2015) Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neurosci Lett* 601:11-19.
- Legastelois R, Botia B, Naassila M (2013) Blockade of ethanol-induced behavioral sensitization by sodium butyrate: descriptive analysis of gene regulations in

- the striatum. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1143-1153.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545-40559.
- Lussier AA, Weinberg J, Kobor MS (2017) Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics* 9:291-311.
- Marutha Ravindran CR, Ticku MK (2004) Changes in methylation pattern of NMDA receptor NR2B gene in cortical neurons after chronic ethanol treatment in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 121:19-27.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moonat S, Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Pandey SC (2013) Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism. *Biol Psychiatry* 73:763-773.
- Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, Pranav H, Monteggia LM (2013) Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *J Neurosci* 33:6401-6411.
- Palmisano M, Pandey SC (2017) Epigenetic mechanisms of alcoholism and stress-related disorders. *Alcohol* 60:7-18.
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14:383-400.
- Rolland B, Naassila M (2017) Binge Drinking: Current Diagnostic and Therapeutic Issues. *CNS Drugs* 31:181-186.
- Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, Kokare DM, Crews FT, Pandey SC (2016) A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Struct Funct* 221:4691-4703.
- Schmauss C (2017) The roles of class I histone deacetylases (HDACs) in memory, learning, and executive cognitive functions: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 83:63-71.
- Schneider M (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res* 354:99-106.
- Silvestre de Ferron B, Bennouar KE, 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.
- Simon-O'Brien E, Alaux-Cantin S, Warnault V, Buttolo R, Naassila M, Vilpoux C (2015) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate decreases excessive ethanol intake in dependent animals. *Addict Biol* 20:676-689.
- Singh P, Konar A, Kumar A, Srivas S, Thakur MK (2015) Hippocampal chromatin-modifying enzymes are pivotal for scopolamine-induced synaptic plasticity gene expression changes and memory impairment. *J Neurochem* 134:642-651.
- Singh P, Thakur MK (2018) Histone Deacetylase 2 Inhibition Attenuates Downregulation of Hippocampal Plasticity Gene Expression during Aging. *Mol Neurobiol* 55:2432-2442.
- Smith KW, Gierski F, Andre J, Dowell NG, Cercignani M, Naassila M, Duka T (2017) Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern. *Addict Biol* 22:490-501.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009) Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9447-9452.
- Valiati FE, Vasconcelos M, Lichtenfels M, Petry FS, de Almeida RMM, Schwartzmann G, Schroder N, de Farias CB, Roesler R (2017) Administration of a Histone Deacetylase Inhibitor into the Basolateral Amygdala Enhances Memory Consolidation, Delays Extinction, and Increases Hippocampal BDNF Levels. *Front Pharmacol* 8:415.

- Walker DM, Cates HM, Heller EA, Nestler EJ (2015) Regulation of chromatin states by drugs of abuse. *Curr Opin Neurobiol* 30:112-121.
- Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S, Ron D (2013) Chromatin remodeling--a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Transl Psychiatry* 3:e231.
- Zhong T, Guo Q, Zou W, Zhu X, Song Z, Sun B, He X, Yang Y (2015) Neonatal isoflurane exposure induces neurocognitive impairment and abnormal hippocampal histone acetylation in mice. *PLoS One* 10:e0125815.
- Zou JY, Crews FT (2014) Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One* 9:e87915.

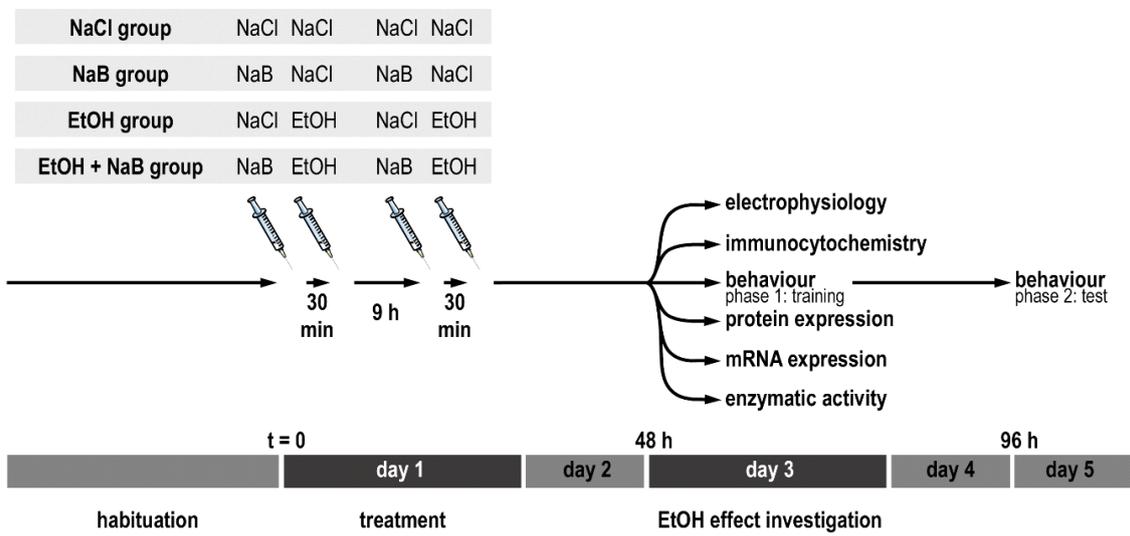


Figure 24: Figure 1: Timeline of the experiments

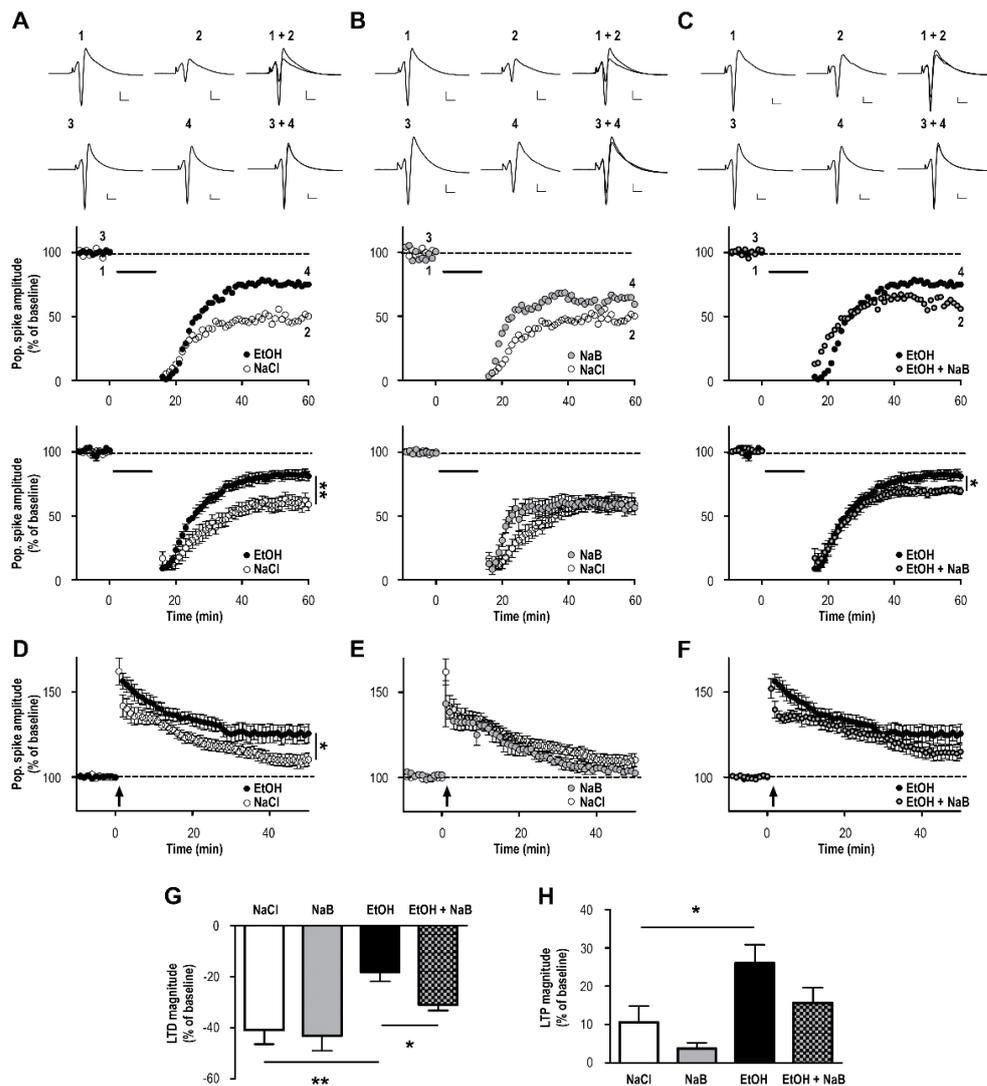


Figure 25: Figure 2: Effect of ethanol, NaB and the combination of both substances on hippocampus synaptic plasticity 48h after the different treatment. A) Long Term Depression (LTD) in control (NaCl) and after ethanol (EtOH). Top traces are averaged signals at time point showed in the graph below. Vertical calibration bar is 0.2mV, horizontal calibration bar is 5 ms. Below the raw traces is the time course of LTD for single slice recording shown on the top. The graph below illustrates the time course of LTD for the whole population of slices. LTD was significantly reduces 48 h after EtOH (NaCl $n = 7$; EtOH $n = 7$). B) Similar representation to describe the lack of effect of NaB alone ($n = 7$) on LTD magnitude and time course as compared to NaCl. C) Illustrates the preventing effect of NaB on EtOH-induced inhibition of LTD (EtOH + NaB $n = 8$). LTD magnitude increased significantly after treatment with NaB 30 min before each EtOH injections. D) Effects of EtOH alone showing an increase in LTP magnitude (NaCl $n = 7$; EtOH $n = 6$). E) NaB alone had no effect on LTP magnitude and time course ($n = 4$). F) NaB pre-treatment decreased LTP magnitude in a non-significant manner ($n = 6$). G) Summary of the results obtained for LTD. H) Summary for LTP. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

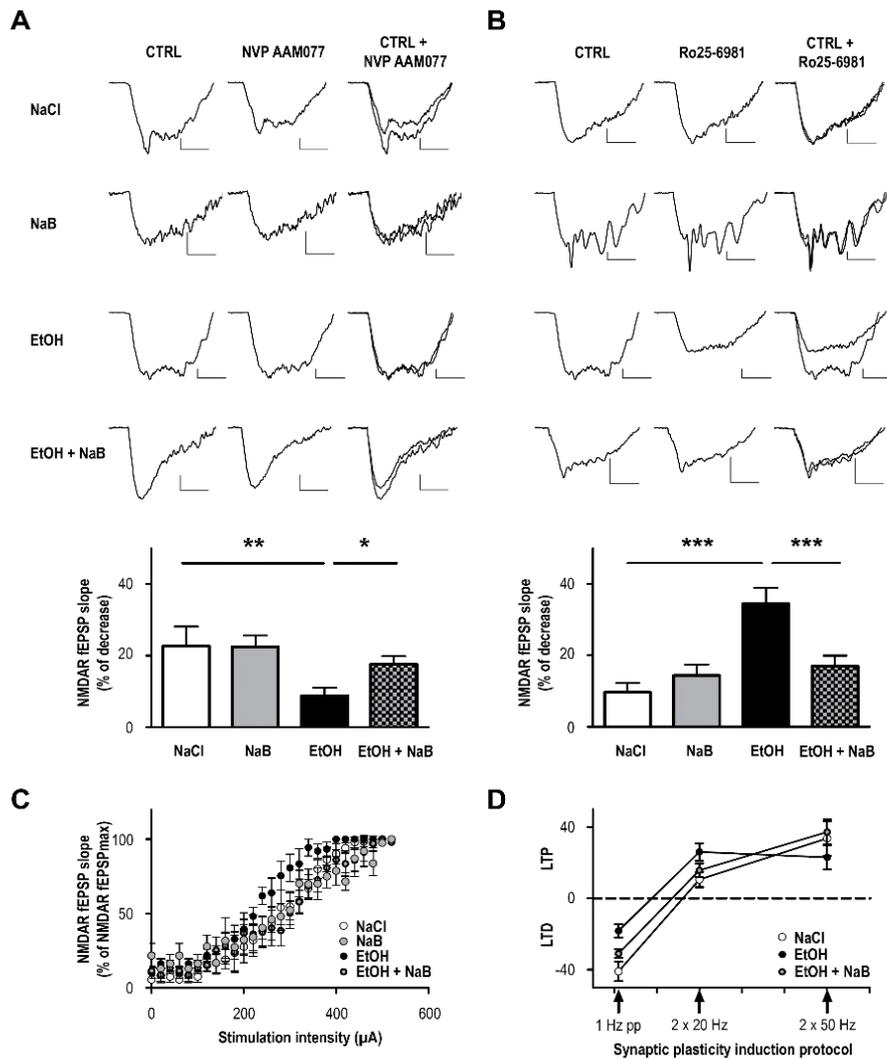


Figure 26: Figure 3: NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists, input/output curve and BCM-like curve. A) Effects of NVP-AAM077, an antagonist of GluN2A subunit on averaged raw traces of NMDA-fEPSPs in different condition as shown on the left: control (NaCl), NaB alone (NaB), EtOH alone (EtOH) and EtOH + NaB. Traces illustrated the baseline condition (left row, CTRL), the drug effect (middle row) and the superimposed traces (right row). The bar graph illustrates the statistic for the whole populations tested. B) Similar presentation than in (A) but for RO25-6981, a GluN2B subunit antagonist; vertical calibration: 0.02mV ; horizontal calibration: 20 ms. C) NMDA-fEPSP slope as a function of stimulus intensity showing that after EtOH (black dots), the relationship is shifted to the left compared to control (open dots, NaCl) whereas after EtOH + NaB, the curve resume to NaCl condition and that NaB had no effect on this relationship (grey dots). D) Bernstein-Cooper-Munro like-curve (BCM), EtOH shifted the curve leftward, revealing difficulties to evoke LTD. In contrast, after EtOH + NaB, the relationship resumed to control level. Same statistic labelling as in figure 2 and ***, $p < 0.001$

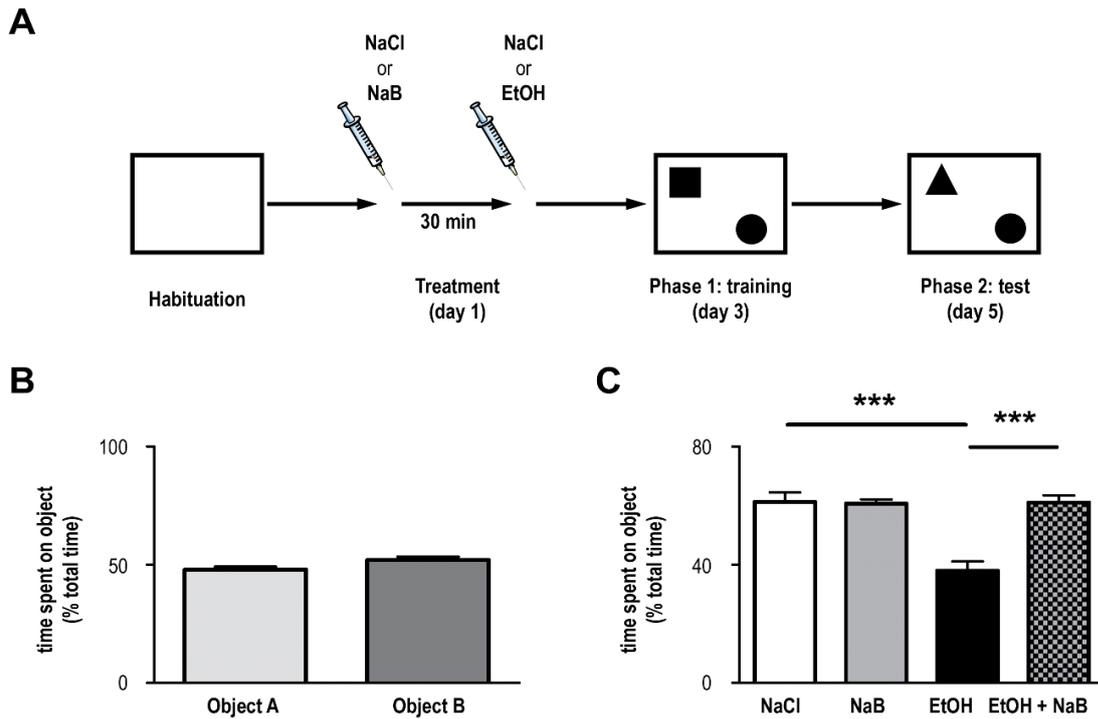


Figure 27: Figure 4: Performance in novel recognition (NOR) task. A) Timeline of this experiment is shown on figure 1. B) Percent of time spent on each object during training phase showing no difference between object A and B and thus no spontaneous preference. C) Percent of time spent on the novel object during test phase after different treatments. After 2 Ethanol administration (3g/kg, i.p., 9 h apart, $n = 10$), animals spent significantly less time on the novel object compared with saline (NaCl) group ($n = 9$). Administration of NaB (600mg/Kg, i.p., $n = 10$), it prevents the effects of Ethanol alone. Same statistic labelling as in figure 2.

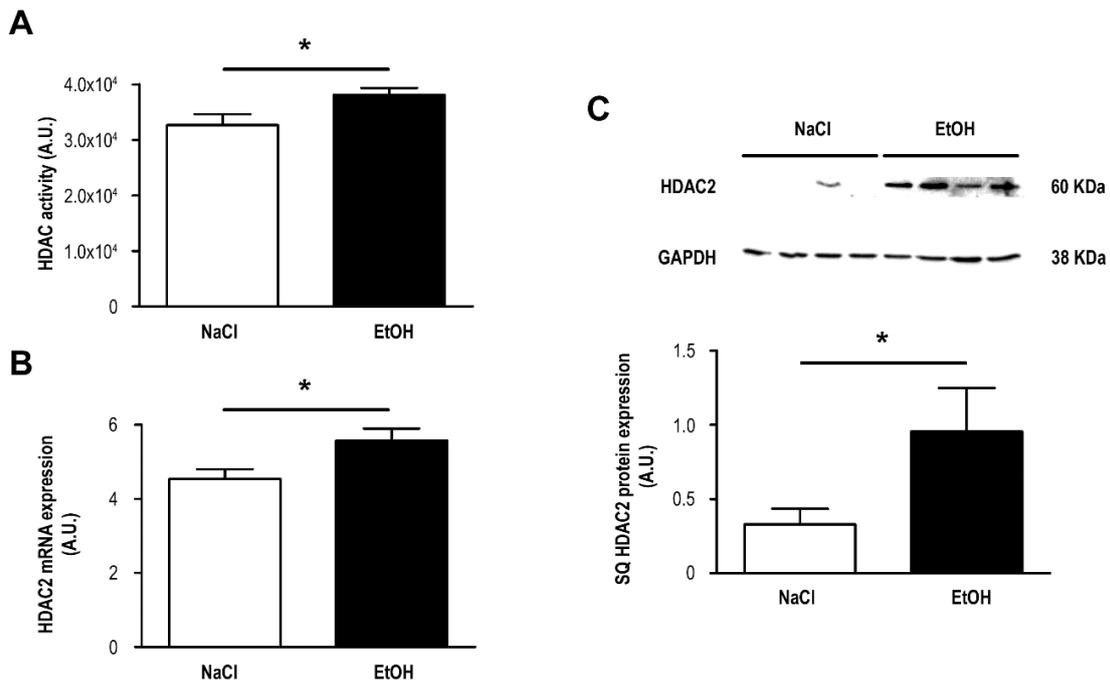


Figure 28: Figure 5: HDAC2 protein expression and mRNA levels and enzymatic activity 48 h after two binge. A) Measurement of enzymatic activity for HDAC I and HDAC II classes in control (NaCl, n = 9) and EtOH-exposed animals revealed a significant increase 48 h after EtOH (n = 9). B) mRNA levels for HDAC2 in CA1 area showed a significant increase 48 h after EtOH treatment (NaCl, n = 10 ; EtOH, n = 9). C) Western-blot for HDAC2 protein levels between control in isolated CA1 (NaCl, n = 9) and EtOH-exposed animals (EtOH, n = 9), relative to GAPDH expression. The bar graph shows that protein level increased 48 h after EtOH exposure. Same statistic labelling as in figure 2.

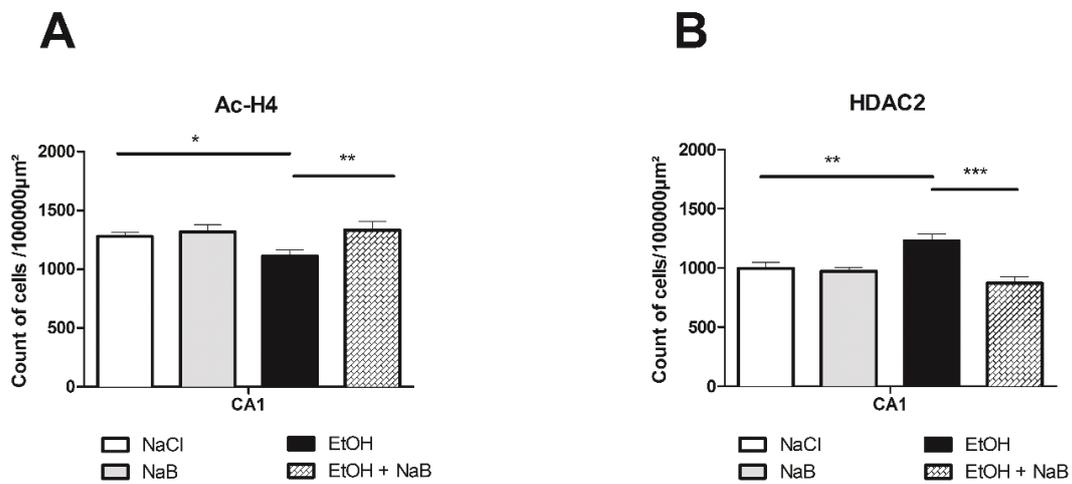


Figure 29: Figure 6: Acetylated H4 and HDAC2 immunolabelling 48 h after two binge drinking-like exposures and the effects of NaB. A) Number of cells labeled for acetylated-H4 (Ac-H4) in CA1 areas after the different treatments. EtOH reduced the number of cells labelled and this effect was prevented by pre-treatment with NaB. B) Number of cells labeled for HDAC2 in the same areas showing a significant increase after EtOH treatment and a prevention effect of NaB pre-treatment. In both cases, NaB tested alone had no effect of the labelling. Same statistic labels as for figure 2.

Supplemental data

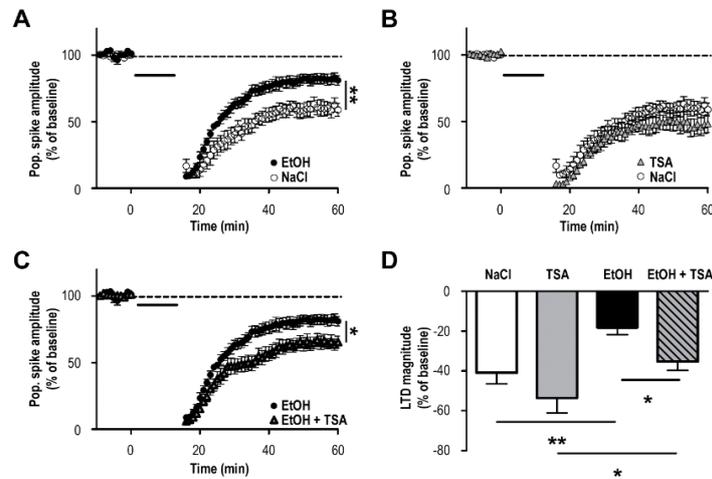


Figure 30: Figure S1: Effect of ethanol, TSA and the combination of both substances on hippocampus synaptic plasticity 48h after the different treatment. A) Long Term Depression (LTD) in control (NaCl) and after ethanol (EtOH). LTD was significantly reduced 48 h after EtOH (NaCl $n = 7$; EtOH $n = 7$). B) Similar representation to describe the lack of effect of TSA alone ($n = 5$) on LTD magnitude and time course as compared to NaCl. C) Illustrates the preventing effect of TSA on EtOH-induced inhibition of LTD (EtOH + TSA $n = 8$). LTD magnitude increased significantly after treatment with TSA 30 min before each EtOH injection. D) The graph below illustrates LTD magnitude during the last 10 minutes for each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

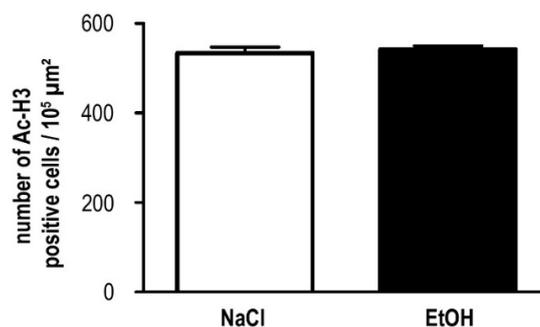


Figure 31: Figure S2: Acetylated H4 immunolabelling 48 h after two binge drinking-like exposures and the effects of NaB. Number of cells labeled for acetylated-H3 (Ac-H3) in CA1 areas after the different treatments in control and after ethanol treatment. EtOH did not change the number of cells labeled.

Heat Shock Transcription Factor 2 (HSF2) modulates hippocampal synaptic transmission, plasticity and neuroadaptations to voluntary ethanol consumption through GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits signaling

Résumé en français

Les facteurs de transcription de type heat shock (HSF) sont connus pour répondre à un stress cellulaire induit par l'élévation de la température en induisant l'expression de gènes à l'origine de la réponse cellulaire. Néanmoins d'autres facteurs, comme l'éthanol, induisent un stress protéotoxique qui active les HSFs. La famille des HSFs est formée de quatre membres, parmi lesquels HSF2 qui semble participer aux défauts de migration cellulaire au niveau cortical suite à une exposition prénatale à l'EtOH (El Fatimy et al., 2014). Outre les défauts de migration cellulaire, l'EtOH induit des troubles d'apprentissage et de mémoire en perturbant la plasticité synaptique bidirectionnelle au niveau de l'hippocampe. Cependant, le rôle de HSF2 dans ces perturbations n'a jamais été étudié auparavant. L'objectif de cette étude est d'évaluer tout d'abord l'implication de HSF2 dans la transmission et la plasticité synaptique dans un état physiologique et d'étudier sa participation à la réponse des neurones de l'hippocampe à l'EtOH. Pour cela, nous avons utilisé des souris sauvages (WT) et des souris transgéniques knock-out (KO HSF2) pour le gène *hsf2* et enregistré la transmission et la plasticité synaptique sur des tranches aiguës de CA1 d'hippocampe en utilisant la technique de potentiel de champs avant et après une exposition à l'EtOH pendant un mois via un protocole de consommation en libre choix. Afin d'étudier d'éventuelles modifications du récepteur NMDA, nous avons évalué les signaux des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA à l'aide d'outils

pharmacologiques. Nos résultats montrent qu'avant toute exposition à l'éthanol, les souris KO HSF2 ne montrent pas de différence de transmission synaptique comparées aux souris WT. En revanche, pour un même protocole électrique, la DLT présente chez les WT, est abolie chez les souris KO HSF2. De plus, l'analyse de la sensibilité des signaux GluN2A et GluN2B à leurs antagonistes spécifiques montrent que chez les souris KO HSF2, l'antagoniste de la sous-unité GluN2B est plus efficace que chez les WT. A l'inverse, l'antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2A est plus spécifique chez les WT que chez les KO HSF2. Ensuite, nous avons exposé les souris à l'éthanol et nous avons commencé par évaluer leur niveau de consommation. L'analyse de la consommation et de la préférence montre que les souris KO HSF2 ne montrent pas de différences significatives comparées aux souris WT. L'analyse des enregistrements électrophysiologiques montrent que l'exposition à l'EtOH augmente la transmission synaptique chez les WT, abolie la DLT et augmente la sensibilité du récepteur NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B. De manière intéressante, les souris KO HSF2 sont insensibles aux effets de l'EtOH sur la transmission et la plasticité synaptique. De plus l'exposition à l'EtOH augmente plutôt le signal GluN2A chez les souris KO HSF2. Cette étude montre pour la première fois que HSF2 participe à la régulation de l'équipement membranaire en récepteur NMDA des neurones pyramidaux de CA1 et régule les sous-unités de ce récepteur en réponse à une exposition chronique à l'EtOH.

Mots clés : HSF2, EtOH, GluN2A, GluN2B, dépression à long terme

Heat Shock Transcription Factor 2 (HSF2) modulates hippocampus synaptic transmission, plasticity and neuroadaptations to voluntary ethanol consumption through GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits signaling

Drissi I.¹, Deschamps C.¹, Alary R.¹, González-Marín M.C.¹, Robert A.¹, Mezger V.², Dubreuil V.², Naassila M.¹, Pierrefiche O*¹.

1-, 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.

2-CNRS, UMR 7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205, Paris Cedex 13, France.

Corresponding author

O. PIERREFICHE

INSERM ERI-24 Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances

Centre Universitaire de Recherche en Santé

Chemin du Thil

CHU-Amiens Sud

80025 Amiens

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

Fax: (0033) (0)3-22-82-76-72

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

Number of words in abstract: 368 !!!

Number of words in the main text:

Number of figures:

Number of table:

Abstract

Heat shock factors (HSFs) are transcription factors that initiate heat-shock response genes under condition of cellular stress such as heat or ethanol-induced proteotoxic stress. Among these factors, HSF2 has been shown to participate to neuronal migration defaults after prenatal ethanol exposure (El Fatimy et al., 2014). Besides neuronal migration defaults, ethanol is known to impair learning and memory through disturbances of bidirectional synaptic plasticity notably in the hippocampus. However, the possible implication of HSF2 in such ethanol effects has never been tested. To evaluate such role for HSF2, we used wild type and knock-out mice for *hsf2* gene (*hsf2*^{-/-}) and assessed both synaptic transmission and plasticity in CA1 area of acute hippocampus slices before and after one month ethanol exposure using a two-bottle choice paradigm. Before ethanol, *hsf2*^{-/-} mice showed similar excitability and synaptic transmission than WT mice. However, long-term synaptic depression (LTD), one of the bidirectional synaptic plasticity signal, was selectively blocked in *hsf2*^{-/-} mice. Additionally, NMDA-fEPSPs in *hsf2*^{-/-} mice were more sensitive to GluN2B subunit antagonist than to GluN2A antagonist. Interestingly, the opposite sensitivity was found in WT mice. At behavioral level, one month of two-bottle choice paradigm showed no differences in ethanol consumption and preference between WT and *hsf2*^{-/-} animals. However, after ethanol exposure, WT animals showed increased synaptic transmission in the hippocampus accompanied with a blockade of LTD and an increase in NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2B antagonist. Interestingly in *hsf2*^{-/-} mice synaptic transmission was unaffected after ethanol and LTD remained absent, suggesting lack of hippocampal response to ethanol. Furthermore, in *hsf2*^{-/-} mice after ethanol NMDA-fEPSPs became more sensitive to GluN2A antagonist than to GluN2B antagonist. This study demonstrated that lack of HSF2 increased GluN2B signal in basal conditions which possibly blocked LTD, suggesting that a high level of GluN2B in CA1 area prevents hippocampus response to ethanol exposure. This study also revealed the

features of hippocampus response to a chronic exposure to ethanol in WT mice resulting in an increase in synaptic transmission, an enhancement of GluN2B signal associated with a blockade of LTD. We conclude that HSF2 modulates GluN2A and GluN2B-dependent synaptic signals determining in turn the capacity to perform synaptic plasticity in the hippocampus but also the response to chronic ethanol exposure.

Key words: HSF2, ethanol, synaptic plasticity, hippocampus, GluN2B, GluN2A, NMDA

Introduction

Heat shock response is a cell defense reaction activated by proteotoxic damage induced by physiological or environmental stress. Cells respond to such damages by elevated expression of heat shock proteins (hsps) which are molecular chaperones maintaining notably the homeostasis of protein folds. Hsps can be induced by various form of stresses such as elevated temperature, ischemia, and some pathologies or ethanol exposure. Heat shock factors (HSFs) are the main transcriptional regulators of the stress-induced expression of hsp genes. HSF2, the protein encoded by *hsf2* gene belongs to the HSFs family similarly to the more characterized HSF1 protein, and both bind to heat-shock promoter elements to activate transcription. Notably, HSF2 binds the hsp70 promoter in mitosis leading to the maintenance of an open chromatin conformation during cell division (Xing et al., 2005). Therefore, a deficiency in HSF2 reduces the ability of cells to induce hsp70 gene expression and to survive stress (Xing et al., 2008). Ethanol exposure, regardless of whether it is acute or chronic is considered a cellular stressful event and can induce the activation of HSFs increasing expression level of hsps. The effect of ethanol on hsps levels have been primarily described in the liver and in the brain. Specifically, ethanol-induced liver injury in rats was accompanied with high level of hsp 70 kDa (hsps70; Nanji et al., 1995) and maternal rat ethanol consumption resulted also in an elevated levels of hsps70 in the offspring brain (Holownia et al., 1995). Further, after fetal alcohol exposure HSF2 was found to have a major role in radial neuronal migration defects in the cortex as an example of cell response to proteotoxic damage (El Fatimy et al., 2014). In this study, mice lacking the *hsf2* gene showed lower migration defects than their wildtype counterparts. Besides ethanol effects during gestation on cell migration, ethanol exposure is known to impair learning and memory, mainly through disturbances of NMDA-dependent forms of long term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), the bidirectional synaptic plasticity signals related to memory processes in the hippocampus

(Kervern et al., 2015; Silvestre de Ferron et al., 2015). Cognitive deficits related to ethanol have been found in young as well as in adult animals (Yang et al., 2017; Matthews et al., 2017; Schambra et al., 2017) and recently, our laboratory found that two ethanol intoxications in young adult rats were sufficient to selectively block LTD in hippocampus slices after 48 h delay, and that such blockade was concomitant of learning impairment in a novel object recognition task. Interestingly, these effects were accompanied with both a greater expression level of GluN2B subunit of the NMDA-R and a greater sensitivity of isolated NMDA-EPSPs to GluN2B antagonist (Silvestre de Ferron et al., 2015). Importantly, these latter results were also found by others (Swartzwelder et al., 2017). Interestingly, application of NMDA at non-lethal levels in retinal ganglion cell layer has neuroprotective effects through time-dependent induction of HSF1 and HSF2 expression (Ahn et al., 2008). NMDA receptor antagonist such as MK-801 evoke psychosis-like effects and neuronal injury as revealed by *de novo* synthesis of hsp70 (Lima-Ojeda et al., 2013). This protein is also increased in the hippocampus following traumatic brain injury or epilepsy and importantly, this increase of hsp70 was associated with increased GluN2B protein levels (Kharlamov et al., 2011; Hussein et al., 2017). Basically, hsp70 and possibly other type of HSPs are protective elements engaged during a cell response to a stress. Thus both NMDA-dependent synaptic plasticity and HSF2 are elements involved in the cellular effects of ethanol. However, whether HSF2 may participate in the ethanol evoked disturbances of synaptic plasticity in the hippocampus and thus to learning and memory deficits is unknown. In this context, we sought to determine whether *hfs2* gene was related to ethanol-induced disturbances of synaptic plasticity in the hippocampus and assessed the possible mechanism of action of HSF2. In addition, we investigated the role of *hsf2* gene in the modulation of voluntary ethanol drinking.

Materials and methods

Animals

All experiments were performed in conformity 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 (French Republic Off. J., 2013) and the regional ethic committee for animal use in Science (CREMEAP). *Hsf2* heterozygous mice described in Kallio et al. (2002) were obtained in a mixed C57Bl/6 N x C57Bl/6 J background. Female wild type (WT) and HSF2

knockout (KO) adult (90-110 days) C57Bl/6 mice were used. Only female mice were tested because female animals sensitize more easily to ethanol than males. Animals were individually housed in a controlled environment under a 12-hour light/dark cycle with food available *ad libitum*.

Voluntary alcohol consumption

Mice were tested in an open access two bottle-choice (2BC) paradigm with a 10 % ethanol solution (v/v from 96 % ethanol, Sigma) and water for 4 weeks. Alcohol intake (g/kg/day) and preference (percentage of ethanol intake to total fluid intake) were calculated. At the end of the 2BC paradigm and before electrophysiology experiments, ethanol was replaced by water for one week in order to avoid ethanol withdrawal effects.

Slices, electrophysiology acquisition and analysis

After anesthesia with isoflurane and decapitation, the brain was immersed in 4°C solution containing in mM: NaCl, 126; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.1; NaHCO₃, 18; MgCl₂, 1.4; CaCl₂, 0.5; ascorbic acid, 1; glucose, 11 (300 mOsm, pH7.2). Four hundred μm thick dorsal hippocampal slices were obtained using a vibratome (Leica VT1200 S) and stored (2h) in an artificial cerebrospinal fluid (aCSF) reservoir saturated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) of the following composition in mM: NaCl, 125; KCl, 3; NaH₂PO₄, 1.25; CaCl₂, 2.3; MgCl₂, 1.3; NaHCO₃, 25; glucose 10; (300 mOsm, pH7.4). For recording, one slice was transferred to a superfused recording chamber continuously perfused at a rate of 6mL/min. A bipolar electric stimulating electrode (Phymep, Paris) was placed in the Schaffer collateral afferent pathway in order to evoke synaptic response. Population spike recordings were made with 3mM NaCl (1-3MΩ) filled glass microelectrodes positioned into the pyramidal cell body layer of CA1 area.

For synaptic plasticity, LTD was induced with a train of 1Hz frequency stimulation delivered 900 times (LFS900) and LTP was induced with 2 stimulations of 1 second duration each, delivered at 50Hz separated by 1s. Extracellular responses were quantified by measuring population spike amplitude and magnitude of synaptic plasticity was determined during the last 10 min of the recordings. To investigate synaptic transmission, an input/output (I/O) relationship was performed to determine the response parameters for each slice at a

frequency stimulation of 0.033Hz (square pulse, duration 100 μ s) for LTD experiments and 0.1Hz for LTP. Stimulus response intensity was increased in 20 μ A steps until the maximal response amplitude was obtained. This curve also allowed to determine the test intensity set at 50% of the maximum amplitude response. Field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) slope was plotted versus presynaptic fiber volley amplitude and regression analysis was obtained using GraphPad prism (GraphPad Software, Inc. CA, USA). The fEPSP's slope was measured between the end of the afferent volley and before the full amplitude of the EPSP. Fiber volley amplitude was measured between the baseline and the peak of the first downward deflection of the recorded trace. Paired pulse facilitation (PPF), tested during baseline recording consisted in a double pulse stimulation at test intensity with an interpulse interval of 50 ms and 100 ms. The ratio of the second over the first pulse was calculated. All results are expressed as percent of decrease compared to baseline value. For fEPSP analysis, the recording electrode was placed into the *stratum radiatum*. NMDA-fEPSPs were recorded in an aCSF solution containing 0.1 mM Mg²⁺. In order to isolate NMDA-fEPSP 50 μ M bicuculline, a GABA_A antagonist, and 10 μ M 6-cyano-7-nitro-quinoline-2,3-dione, an AMPA/Kainate antagonist were added to the aCSF. At the end of recording, 20 μ M DL-2-amino-5-phosphonopentanoic (APV) was added to check for the NMDA dependency of the EPSP. The role of GluN2A and GluN2B subunits were assessed using 20 nM NVP AAM077 and 10 μ M RO 25-6981 as selective antagonists of GluN2A and GluN2B, respectively. Synaptic responses, either population spike or NMDA-fEPSPs, were recorded at similar afferent volley amplitude. All signals were amplified (Grass amplifier, x1000-2000), filtered (1-3 KHz), and acquired on computer with Signal software (CED, Cambridge, UK) for off-line analysis. Only slices showing at least 10 min of stable baseline were used and measurements were averaged every minute. For electrophysiology, *n* is the number of slices tested. Because of neuronal migration defects induced by *hsf2* gene deficiency (Kallio et al., 2002), the dorsal hippocampus was smaller than in WT animals and a maximum of 3 slices per KO animal were workable. Recordings were performed in naïve mice never exposed to ethanol, and one week after the end of the two bottle-choice (2BC) paradigm, called 2BC mice hereafter.

Statistics and Data presentation

All data are presented as mean \pm SEM except for population spike amplitude during baseline and synaptic plasticity or when individual (*per slice*) absolute values are presented. Statistics analysis of excitability and synaptic plasticity were performed on raw data with unpaired student's t-test and two-way repeated measures ANOVA (RM-ANOVA). Unpaired Student's t-test was used to compare the magnitude of LTP and LTD in a given population of mice and between populations and also for the percentage of decrease of NMDA-fEPSP slope in our different experimental conditions. RM-ANOVA was also used to compare PPF ratio at each interpulse interval tested. Averaged signals (60 sweeps for LTP and 30 sweeps for LTD) and superimposed raw signal taken before and after synaptic plasticity are shown on figures illustrating electrophysiology results. In all statistical measurements, $P < 0.05$ was chosen as significant level

RESULTS

Synaptic transmission in CA1 area of HSF2 deficient mice

In order to understand the effect of HSF2 deficiency on synaptic transmission, we analyzed whether lack of *hsf2* gene affected basal neurotransmission in the hippocampus network by assessing intrinsic excitability and neurotransmitter release. For this purpose, input/output curves in WT naïve and in *hsf2*^{-/-} naïve mice were compared (Fig. 1A). Our results showed that the curves were superimposed (Fig. 1A) with no difference in the I50 values between mice populations (WT naïve: $304.6 \mu\text{A} \pm 23.75$, $n = 7$, vs *hsf2*^{-/-} naïve: $355.4 \mu\text{A} \pm 22.22$, $n = 5$, $P > 0.05$; Fig. 1B). Similarly, absolute values of the maximum response in the two populations were not significantly different (WT naïve $2.02 \text{ mV} \pm 0.22$, $n = 7$, vs *hsf2*^{-/-} naïve $1.97 \text{ mV} \pm 0.14$, $n = 5$, $P > 0.05$; Fig. 1C). In addition, the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was mostly superimposed although it was shifted leftward in naïve KO mice at the lower intensities tested (Fig. 1D). Regarding PPF measurements, RM-ANOVA showed no difference between WT naïve and *hsf2*^{-/-} naïve mice at any intervals tested, suggesting no effect of *hsf2* gene deletion on presynaptic release mechanisms (Fig. 1E). Globally, these

results suggest no effect of *hsf2* gene deletion on basal synaptic transmission in CA1 area of the hippocampus.

Disturbances of synaptic plasticity in HSF2 deficient mice

Next, we studied bidirectional synaptic plasticity in HSF2 deficient mice (Fig. 2) and found that LTP was unchanged in *hsf2*^{-/-} naïve mice when compared to WT naïve mice (Fig. 2A1). Magnitude of LTP in WT mice reached + 70.15 ± 4.18 % of baseline (n = 9) while LTP was + 68.53 ± 12.43 % in *hsf2*^{-/-} mice (n = 3) with P > 0.05 (Fig. 2A2). In contrast, LTD induced with a train of 1Hz frequency stimulation delivered 900 times was abolished in *hsf2*^{-/-} mice (Fig. 2B1). Indeed, LTD reached -30.68 ± 6.0 % of baseline in WT naïve mice (n = 10; P < 0.0001, Fig. 2B2) and -5.89 ± 5.71 % in *hsf2*^{-/-} naïve mice (n = 6; P = 0.298, Fig. 2B2) with P = 0.015 between populations (Fig. 2B1). Altogether these data revealed that lack of *hsf2* gene lead to a selective incapacity to perform LTD while LTP induction and maintenance were both unaltered.

Voluntary ethanol consumption

It is known that ethanol consumption or exposure alters synaptic plasticity notably in the hippocampus. Recently we reported that few ethanol intoxications blocked LTD in the hippocampus after a delay of 48 h (Silvestre de Ferron et al., 2015). Here, the fact that *hsf2* KO mice had no LTD in basal conditions suggested the hippocampus response to ethanol exposure in these mice would be different than in WT mice. Therefore, we submitted *hsf2*^{-/-} and WT mice to a two-bottle choice (2BC) alcohol access for 4 weeks. Our measurements revealed that *hsf2*^{-/-} mice consumed relatively less ethanol than WT mice along the four weeks of the test since level of consumption of *hsf2*^{-/-} mice was always below control level (Fig. 3A). However, ANOVA revealed this result as inconsistent since only few measurements were significantly different between populations throughout the experiment (Fig. 3A) and the same applied to preference (Fig. 3B). Therefore, we further analyzed the last three days of measurements and found there was no difference between population in both the level of

consumption and the preference for ethanol at the end of one-month ethanol exposure (Fig. 3C-D). Therefore, at the end of alcohol exposure, there was no difference in both alcohol consumption and preference for the two animal populations. Mean consumption within the last three days of measurements was 10.64 ± 0.79 g/kg/day for WT 2BC animals ($n = 17$) and 9.27 ± 0.93 g/kg/day for the *hsf2*^{-/-} 2BC mice ($n = 12$), with $P > 0.05$ between populations (Fig. 3C). The preference for ethanol was also not significantly different between populations at the end of ethanol exposure (WT 2BC: 59.2 ± 3.85 %, $n = 17$ vs *hsf2*^{-/-} 2BC: 57.57 ± 4.594 %, $n = 12$, $P > 0.05$; Fig. 3D).

Hippocampus synaptic transmission and plasticity in WT mice after ethanol

After 2BC paradigm, the I/O curve was shifted leftward in WT mice compared to WT naïve mice (Fig. 4A), revealing an adaptation of the hippocampus network to ethanol in WT animals. In consequence, the I50 value was lower in WT 2BC than in WT naïve mice (WT naïve: 306.3 ± 13.5 μ A, $n = 7$ vs WT 2BC: 217.1 ± 27.5 μ A, $n = 6$, $P = 0.01$; Fig. 4B) and the maximum of response to stimulation was also higher in WT 2BC than WT naïve (WT 2BC: 1.6 mV ± 0.1 , $n = 7$ vs WT 2BC: 2.8 mV ± 0.2 , $n = 6$, $P = 0.001$; Fig. 4C). In addition, the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was shifted leftward in WT 2BC mice for most of the intensities tested, revealing that afferent volley amplitude was higher after ethanol than in WT naïve mice for almost any given stimulus intensity (Fig. 4D). Finally, PPF (Fig. 4E) analysis revealed no difference at any interval before and after ethanol exposure in WT mice. RM-ANOVA showed no ethanol effect. These measurements revealed that the response of the hippocampus network to chronic ethanol exposure in WT mice is an increase in synaptic transmission without any effect on transmitter release probability.

Next, we checked whether the changes observed in synaptic transmission in WT mice after ethanol would lead to any alteration in synaptic plasticity. We analyzed LTP and found no differences (Fig. 5A1). LTP magnitude was significantly reduced in WT 2BC mice compared to WT mice (WT 2BC: 37.07 ± 12.99 %, $n = 5$ vs WT naïve: 70.51 ± 4.18 %, $n = 7$, $P > 0.05$; Fig. 5A2). In contrast and interestingly, LTD was abolished in WT mice after ethanol consumption ($P = 0.002$ between populations, Fig. 5B1). In WT 2BC mice, LTD reached 3.2 ± 9.3 %, of baseline

value ($n = 7$; $P = 0.78$; Fig. 5B1-B3), whereas it was -30.68 ± 6.0 % of baseline in WT naïve animals ($n = 10$, $P < 0.0001$; Fig. 5B1-B3). The difference between populations was significant with $P = 0.006$. Thus, the increase in synaptic transmission after ethanol consumption in WT mice was accompanied with a selective blockade of LTD.

Response to ethanol of HSF2 deficient mice: synaptic transmission and plasticity

Similar analysis were performed in KO mice after ethanol exposure. Interestingly, in slices from these animals the I/O curves were similar in KO 2BC and KO naïve mice (Fig. 6A), revealing no effects of ethanol on intrinsic excitability. Thus, the I50 values showed no difference before and after ethanol consumption in HSF2 KO mice (KO naïve: 343.2 ± 21.2 μ A, $n = 5$ vs KO 2BC: 322.7 ± 31.7 μ A, $n = 6$, $P = 0.31$; Fig. 6B) and similarly the maximum of response was the same after ethanol than before (KO naïve: 1.9 ± 0.3 mV, $n = 9$ vs KO 2BC: 2.1 ± 0.3 mV, $n = 12$, $P = 0.6$; Figure 6C). Similarly, to I/O curves, the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was unaltered after ethanol consumption (Fig. 6D). This lack of effects of ethanol was still observed when the slope of the EPSP was taken into account (Fig. 6E). Additionally, PPF showed no difference before and after ethanol consumption in HSF2 KO mice at any intervals (Figure 6E). RM-ANOVA shows no difference. In summary, in *hsf2* deficient mice, there was no neuroadaptation of the hippocampus network to ethanol in terms of synaptic transmission and presynaptic release probability.

The previous result showed that ethanol exposure did not alter basal synaptic transmission in *hsf2* deficient mice. Therefore, after ethanol consumption, *hsf2* KO mice showed similar network properties than naïve KO mice. With such results we anticipated that synaptic plasticity in KO mice after ethanol consumption should be similar than what was measured in naïve KO mice. Indeed, after ethanol, KO mice showed no alteration in LTP magnitude (Fig. 7A1-A2). LTP was 68.53 ± 12.43 % ($n = 3$) of baseline in KO naïve mice and 58.1 ± 9.01 % in 2BC KO mice ($n = 7$); $P > 0.05$). Regarding LTD magnitude we found that after 2BC paradigm, LTD reached -3.916 ± 5.7 % of baseline ($n = 7$; $P = 0.46$; Fig. 7B1-B3), a value that was not different from naïve KO mice LTD (-5.89 ± 5.17 %, $n = 6$, $P = 0.298$) and thus there was no statistical difference between populations in term of LTD magnitude ($P = 0.812$, Fig. 7 B1-B2). LTD was

blocked before ethanol in KO naïve mice, and it remain so after ethanol consumption. Altogether, these data showed that *hsf2* deficient mice do not respond to ethanol exposure in terms of synaptic plasticity.

Response to GluN2A and GluN2B antagonists in WT and KO mice, before and after ethanol

Hsf2 deficient mice did not show alterations/neuroadaptations in both synaptic transmission and plasticity in the hippocampus after ethanol as compared to WT counterparts. Then, we hypothesize such difference may arises from the basal properties of synaptic transmission in KO mice that may be responsible for the lack of LTD before ethanol exposure. Therefore, in order to better understand why *hsf2* deficient mice presented no LTD in basal conditions but also how the hippocampus network adapted to ethanol exposure in these mice as well as in their WT counterparts, we analyzed the responses of isolated NMDA-fEPSPs to both GluN2A and GluN2B subunits antagonists (Fig. 8A-B). Before ethanol consumption, NVP AAM077 (20 nM), a GluN2A antagonist, was more efficient in reducing NMDA-fEPSPs in WT naïve than in KO naïve mice (Fig. 8A1). In WT naïve mice, NVP AAM077 reduced the slope of fEPSPs by $26.4 \pm 6.1 \%$, while it reduced the slope by $7.5 \pm 2.0 \%$ in KO mice (Fig. 8 A1, $P < 0.05$). Interestingly, the opposite was found regarding the sensitivity to RO25-6981 (10 μ M), an antagonist of GluN2B subunit (Fig. 8 A2). RO25-6981 was more efficient in KO naïve mice than in WT naïve mice ($-22.2 \pm 6.8 \%$ vs $-5.2 \pm 1.4 \%$, respectively, $P < 0.05$). After ethanol exposure, WT 2BC mice showed a lower sensitivity to GluN2A antagonist as compared to KO 2BC mice ($-11.9 \pm 3.9 \%$ vs $-29.4 \pm 5.8 \%$, respectively, $P < 0.05$, Fig. 8 B1). In contrast, WT 2BC mice showed a higher sensitivity to GluN2B antagonist compared to KO 2BC ones ($-23.8 \pm 2.6 \%$ in WT 2BC mice and $10.1 \pm 2.8 \%$ in KO 2BC, $P < 0.05$, Fig. 8 B2). Further analysis demonstrated that ethanol exposure in WT mice was accompanied with a significant increase in the effect of GluN2B antagonist (from $-5.2 \pm 1.4 \%$ to $-23.8 \pm 2.6 \%$, $P < 0.05$) and a significant decrease in GluN2A blockade efficiency (from $-26.4 \pm 6.1 \%$ to $-11.9 \pm 3.9 \%$, $P < 0.05$). Interestingly, it was the opposite in KO mice since they showed a high sensitivity to GluN2B antagonist before ethanol which was significantly reduced after ethanol (from $-22.2 \pm 6.8 \%$ to $-10.1 \pm 2.8 \%$, $P < 0.05$) while sensitivity to GluN2A antagonist was significantly increased after ethanol (from $-7.5 \pm$

2.0 % to -29.5 ± 5.8 %, $P < 0.05$). In summary, in baseline conditions NMDA-fEPSP was differentially and oppositely sensitive to GluN2A and GluN2B antagonists between WT and *hsf2* KO mice and the adaptive response to ethanol in terms of pharmacological sensitivity to antagonists was the opposite between the two populations of mice.

Discussion

This study shows that lack of *hsf2* gene induced a selective synaptic plasticity impairment in the hippocampus associated with an abnormally high sensitivity to GluN2B subunit antagonist and no alteration in ethanol voluntary consumption. Furthermore, after ethanol exposure, analysis of synaptic transmission and plasticity in *hsf2*^{-/-} mice revealed lack of adaptation of the network to ethanol in contrast to what was measured in WT animals for which the features of hippocampus neuronal network response to ethanol were defined. Globally, the present experiments suggest that *hsf2* participates to the modulation of basal functioning of glutamatergic synapses through modulation of GluN2B and GluN2A subunits synaptic signals which in turn dictates both the capacity to perform synaptic plasticity in basal conditions and thus the response of the hippocampus network to chronic ethanol exposure.

Hsf2-deficient mice has no LTD in basal conditions

An interesting result of the present study is that *hsf2* deficient mice had no NMDA-dependent LTD in CA1 area of the hippocampus in basal conditions while LTP was unaltered, as compared to WT animals. This selective effect of *hsf2* gene deletion on synaptic plasticity capabilities was not accompanied with changes affecting basal synaptic transmission or presynaptic release probability since I/O curves, relationship between afferent volley amplitude and EPSPs slope, as well as PPF tests were all unaltered in KO mice compared to WT animals. These measurements suggest that *hsf2* gene deletion do not evoke changes in basal synaptic transmission and that LTD defect in *hsf2*^{-/-} mice is of post-synaptic origin. A post-synaptic locus of LTD blockade may come from a different receptor equipment of the membrane. In this

context, the pharmacologic tests performed on isolated NMDA-fEPSPs revealed a higher sensitivity to GluN2A antagonist than to GluN2B antagonist in WT animals whereas interestingly, it was the opposite in *hsf2*^{-/-} mice. The differential sensitivity found in WT animals may reflect the higher proportion of NMDA receptors containing the GluN2A subunit in comparison to NMDA receptors containing the GluN2B subunit, a result commonly expected from mature glutamatergic synapse which present a high expression level of GluN2A and a low expression of GluN2B subunits (Paoletti et al., 2013). Thus, and because the opposite sensitivity to antagonists was found in *hsf2* deficient mice, this suggests a possible increase in GluN2B subunit expression related to lack of HSF2 protein in these animals. Another possibility however, could be an altered distribution of NMDA receptor containing the GluN2B subunit between synaptic and peri/extrasynaptic sites in the two animal populations since GluN2B subunit is preferentially found at the latter sites (Groc et al., 2009). Nonetheless, lack of HSF2 protein induced an imbalance in GluN2A over GluN2B NMDA receptor subunit signals in baseline synaptic transmission. Interestingly, subunits signal imbalance was accompanied with lack of NMDA-dependent LTD in *hsf2* deficient mice. The combination of LTD blockade and increased sensitivity to GluN2B antagonist in *hsf2* deficient mice will indeed fit the Bernstein-Cooper-Munro curve which describes the capability of a synapse to perform either LTD or LTP according to GluN2A-to-GluN2B subunit ratio. This curve defined that a low probability of LTD induction occurred when GluN2A-to-GluN2B ratio is low, i.e., when GluN2B expression is high. In accordance with this notion, we previously demonstrated that in case of a high sensitivity of NMDA-fEPSPs to a GluN2B antagonist, the NMDA-dependent LTD is effectively blocked (Silvestre de Ferron et al., 2015). In summary, we propose that *hsf2* deficient mice do not express NMDA-dependent LTD probably because GluN2B subunit expression or involvement is increased in basal conditions leading to a reduction in GluN2A-to-GluN2B signal ratio and thus, to a lower capacity to evoke LTD. However, the link that may exist between HSF2 protein and GluN2B subunit either in terms of expression level or functioning is not yet known and requires further experiments.

Features of the response to ethanol in the hippocampus network

Another important result of our study is that measurements performed in WT animals before and after one-month ethanol consumption allowed us to determine the features of the response of hippocampal network to chronic voluntary ethanol exposure in terms of both synaptic transmission and plasticity. Concerning synaptic transmission, we found that one month ethanol exposure through a 2 bottle-choice paradigm (2BC) induced several significant changes. First, the I/O curve indicating intrinsic excitability of the network was shifted leftward meaning that for a same intensity of stimulation the amplitude of the synaptic signal become stronger after ethanol. This effect suggests an increase in excitability and thus in synaptic transmission. Such notion was supported by other measurements such as the intensity value necessary to evoke 50 % of the maximum response and the response recorded at the maximum intensity tested in our experimental conditions. All three parameters indicated a significant increase in network responsiveness compared to before ethanol exposure. However, an increase in the capacity of the network to respond to input stimulation may arise from several sources. Such increase in responsiveness may be due to an increase in glutamate release or it may arise from a more efficient presynaptic fibers recruitment, or it may come from a change in postsynaptic membrane equipment in receptors. We do not believe the first solution as possible since PPF measurements did not show any significant differences in WT animals before and after ethanol, suggesting the presynaptic release probability was not affected by ethanol. This result is in accordance with numerous previous studies including ours, performed in the hippocampus and following different ethanol exposure paradigms, (Krahl et al., 1999; Kervern et al., 2015; Silvestre de Ferron et al., 2015; Hernandez et al., 2016). The second possibility could have taken place since we measured a leftward shift of the relationship between afferent volley amplitude and EPSPs slope after ethanol in WT mice. Further, this shift was still visible after taking into account the post-synaptic fEPSPs slope. Therefore, the increased in excitability after ethanol was possibly and partly due to facilitated presynaptic fibers recruitment. The third suggestion is another possibility to explain our results. Based on the pharmacological tests with GluN2A and GluN2B antagonists on isolated NMDA-fEPSPs, ethanol exposure in WT animals was accompanied with an increased sensitivity to GluN2B antagonist while sensitivity to GluN2A antagonist was reduced. This type of change after ethanol in the hippocampus have been already reported (Silvestre de Ferron et al., 2015; Swartzwelder et al., 2017), and suggests a change in NMDA-receptor subunit expression due to ethanol. Indeed, ethanol-induced up-regulation of GluN2B-containing NMDA receptor

expression and function has been thoroughly reported in several studies (Silvestre de Ferron et al., 2015; den-Hartog et al., 2017; Lee et al., 2016; Cozzoli et al., 2014) and although such adaptations are often circuit- and cell-specific (Burnett et al., 2016), it is believed that such response reflects activity-dependent adaptive homeostatic plasticity. Indeed, we found alterations of synaptic plasticity in WT mice after ethanol in addition to changes affecting synaptic transmission. What was found was a selective blockade of NMDA-dependent LTD (but not LTP) after ethanol exposure. We believe this ethanol-induced alteration should be put in parallel with the increase in sensitivity to GluN2B antagonist after ethanol in WT animals. According to previous experiments (Silvestre de Ferron et al., 2015; Kervern et al., 2015), we propose that ethanol exposure increase GluN2B expression and/or involvement at postsynaptic level. Because of electrophysiological properties of this NMDA receptor subunit (Paoletti et al., 2013), the influx of calcium into the postsynaptic cells become higher than before ethanol, leading to a leftward shift of the Θ threshold for synaptic plasticity induction in the BCM curve (Paoletti et al., 2013; Silvestre de Ferron et al., 2015). This sliding effect on Θ threshold will result in difficulties to trigger LTD in the network. In summary, the response of the hippocampus network to chronic ethanol exposure in WT animals is an increase in synaptic transmission due partly to an enhanced presynaptic fibers recruitment associated with an enhanced sensitivity of NMDA-EPSPs to GluN2B antagonist in addition to a decrease sensitivity to GluN2A antagonist and, these phenomena finally result in a selective blockade of NMDA-dependent LTD. Surprisingly, LTP magnitude was unaltered after ethanol. This unexpected result because presynaptic fibers recruitment and GluN2B sensitivity were enhanced while GluN2A sensitivity was reduced, suggest that the electric protocol we used was possibly too strong, saturating then the network possibilities regarding LTP induction. In fact, in another study with comparable conditions, lowering stimulus intensity for LTP (Silvestre de Ferron et al., 2015) revealed a higher level of LTP which is in accordance with a high expression level of GluN2B subunit (Hager et al. 2015; Tang et al., 2015) and confirms ethanol-induced metaplasticity.

The hippocampus network in *hsf2*-deficient mice do not adapt to ethanol exposure

Hsf2 deficient mice showed a specific reduction in the capability to evoke NMDA-dependent synaptic plasticity in the hippocampus in basal conditions accompanied with an abnormal high involvement of GluN2B subunit of the NMDA receptor in synaptic transmission. This subunit of the NMDA receptor is known to be highly sensitive to ethanol (Silvestre de Ferron et al., 2015; Naassila and Pierrefiche, 2018; Hopf, 2017) and thus submitting *hsf2* deficient mice to ethanol exposure was of importance to reveal the possible role of GluN2B in both the response of neuronal network to ethanol and in ethanol consumption behavior. In addition to the present data which reveal previously unknown electrophysiological properties of *hsf2* deficient mice, Kallio et al. (2002) described these mice at physiological level. These authors reported that these mice are born at the expected mendelian ratio but with meiotic and gametogenic defects in both genders. Many disturbances occurred on the reproductive system and capability in both *hsf2*^(-/-) males and females, such as abnormal egg production in females, reduced ovarian follicle number, and hemorrhagic cystic follicles that were all consistent with meiotic defects. *Hsf2*^(-/-) females also showed hormone response defects and abnormal luteinizing hormone receptor mRNA levels. Consequently, the reproduction of these mice is difficult and the number of animals available for experiments was relatively low, increasing the difficulty to collect data. Brain abnormalities also occurred in these mutant mice. Lateral and third ventricles are enlarged while the hippocampus and the striatum are reduced in correlation with HSF2 expression in proliferative cells of the neuroepithelium and in some ependymal cells in the adults. Interestingly, in the absence of HSF2, migration defects as well as alterations in gene expression induced in offspring brain after fetal alcohol exposure were reduced (El Fatimy et al., 2014), suggesting HSF2 is a sensor of alcohol stress in the fetal brain and a mediator of neuronal migration defects associated with fetal alcohol spectrum disorder. In our experiments, all synaptic plasticity experiments were performed at similar afferent volley amplitude supporting the notion that synaptic plasticity disturbances after ethanol were due to ethanol effects on the mechanisms (induction and/or maintenance) of synaptic plasticity rather than simply or only, a change in synaptic excitability within the network. Interestingly, after ethanol exposure *hsf2* deficient mice showed none of the features of WT mice response to ethanol. *Hsf2*^(-/-) mice did not show any increase in synaptic transmission after ethanol, revealed by the lack of leftward shift of the I/O curve and no changes in the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity and then, LTD which was absent before ethanol, remained absent after ethanol exposure.

Therefore, we may assume the difference in the response to ethanol between *hsf2*^(-/-) mice and WT counterparts is because of the lack of HSF2 protein. Behaviorally, no difference was measured in both ethanol consumption and preference after one-month 2BC although the two animal populations escalated their consumption of ethanol along the experiment. According to *hsf2*^(-/-) mice's higher sensitivity to GluN2B antagonist compared to WT mice, this result may seem surprising. Indeed, it was reported that selective deletion of GluN2B in cortical interneuron or reduction of GluN2B phosphorylation level is accompanied with less ethanol consumption (Ben Hamida et al., 2015; Radke et al., 2017) whereas enhancing GluN2B phosphorylation level accompanied an increase in ethanol intake (Darcq et al., 2014). All these previous studies suggest a possible relationship between the level of GluN2B and the level of ethanol consumption. However, an important difference between those experiments and the present one is that manipulation of GluN2B was previously performed in selective region or cells while we used an organism lacking GluN2B subunit in the entire brain. In addition, because *hsf2* deficient mice showed several physiological and neuronal anomalies it is possible that our population was too heterogeneous and that we should have increase the number of animals tested. Nevertheless, the tendency in our results if any, was a decrease in ethanol consumption suggesting that the relationship between GluN2B and HSF2 protein do not have the same consequence in these KO mice than in other studies.

What could be a possible mechanism between HSF2 and GluN2B?

El Fatimy et al. (2014) indicated that HSF2 sensed alcohol stress in the fetal brain and mediates neuronal migration defects associated with fetal alcohol spectrum disorder in mice. Interestingly, these authors found that HSF2 formed atypical alcohol-specific HSF1-HSF2 heterocomplexes, disturbing the *in vivo* binding of HSF2 to heat shock elements in genes that control neuronal migration in normal conditions. The functional consequence of the HSF1-HSF2 interplay was demonstrated by RT-PCR analyses showing that HSF2 modulates the HSF1-mediated expression of major *hsp* genes. Therefore, HSF2 participates in the transcriptional regulation of the heat shock response (Ostling et al., 2007). Using preconditioning doses of NMDA at non-lethal levels in retinal ganglion cell layer, neuroprotective effects was triggered

through time-dependent induction of HSF1 and HSF2 expression (Ahn et al., 2008). In the present study, such interplay between the two major HSFs is lacking in *hsf2*^(-/-) mice suggesting these mice could not engage heat shock response in a proper way. HSPs are major endogenous markers of cell stress and injury with various cellular functions. Ethanol exposure can be stressful at cellular level and several studies reported an increase in HSPs expression following either acute or chronic ethanol exposure. Such results were primarily reported in rats in ethanol-induced liver injury (Nanji et al., 1995) and in the offspring brain following maternal ethanol consumption (Holownia et al., 1995) or in rat adult brain acutely or chronically treated with low or high doses of ethanol (Calabrese et al., 1996; 1998). In all cases an elevated level of hsp 70 kDa (hsp70) was reported revealing an association between ethanol exposure and hsp70 although such association is not specific to ethanol since it has been also observed following sub-chronic cocaine treatment (Hayase et al., 2003). Several studies demonstrated a remarkable neuroprotective activity of increased hsp70 in different models of pathology affecting the hippocampus such as traumatic brain injury or epilepsy (Lin et al., 2004, Kharlamov et al., 2011; Chan et al., 2014; Hussein et al., 2017). Also, high level of hsp70 protein prevents scopolamine-induced LTP impairment (Lin et al., 2004) and is protective against A β (1-42) toxicity towards cognitive function (Zare et al., 2015). In contrast and importantly, when hsp70 gene expression is downregulated or HSF2 protein is lacking or when its action is blocked, it leads to reduced ability of cells to survive stressful events (Xing et al., 2005; 2008). Altogether, this literature suggest hsp70 is part of the response to ethanol and has an important role in protecting cellular integrity including synaptic plasticity capabilities in some pathologies. Therefore, it is not surprising that lack of HSF2 protein which modulates hsp70 gene is accompanied with deficit in some forms of synaptic plasticity as described in the present study. Interestingly, a parallel upregulation of the GluN2B subunit at least in the hippocampus was demonstrated in some models of pathologies when hsp70 increases (Kharlamov et al., 2011) although this was not found in all experiments (see Giza et al., 2006), suggesting a possible link between GluN2B and HSF2. In our experimental conditions lack of *hsf2* gene was accompanied with an increased sensitivity to GluN2B antagonist, further suggesting a link between these two factors. However, the exact link between these two elements is not yet strongly established. Another possibility for hsp70 to act on cellular activity can be related to its colocalization with the GABA-synthesizing enzyme, L-glutamic acid decarboxylase 67 in models of epileptic-like activity suggesting hsp70 protective effect is via

modulation of GABA neurotransmission, at least in these cases (Ekimova et al., 2010). This last hypothesis would need to be tested in our experimental model.

In conclusion, we showed that hsf2 gene fully participate to NMDA-dependent signaling through the modulation of GluN2A and GluN2B subunit involvement in NMDA-fEPSP in basal conditions. Lack of hsf2 gene revealed that the level of NMDA-receptor subunit involvement in excitatory transmission dictates the capacity of the synapse to elicit certain forms of synaptic plasticity. In consequence of these measurements, we were able to demonstrate that network adaptive response to chronic ethanol exposure depends upon the level of involvement of GluN2A and GluN2B subunits.

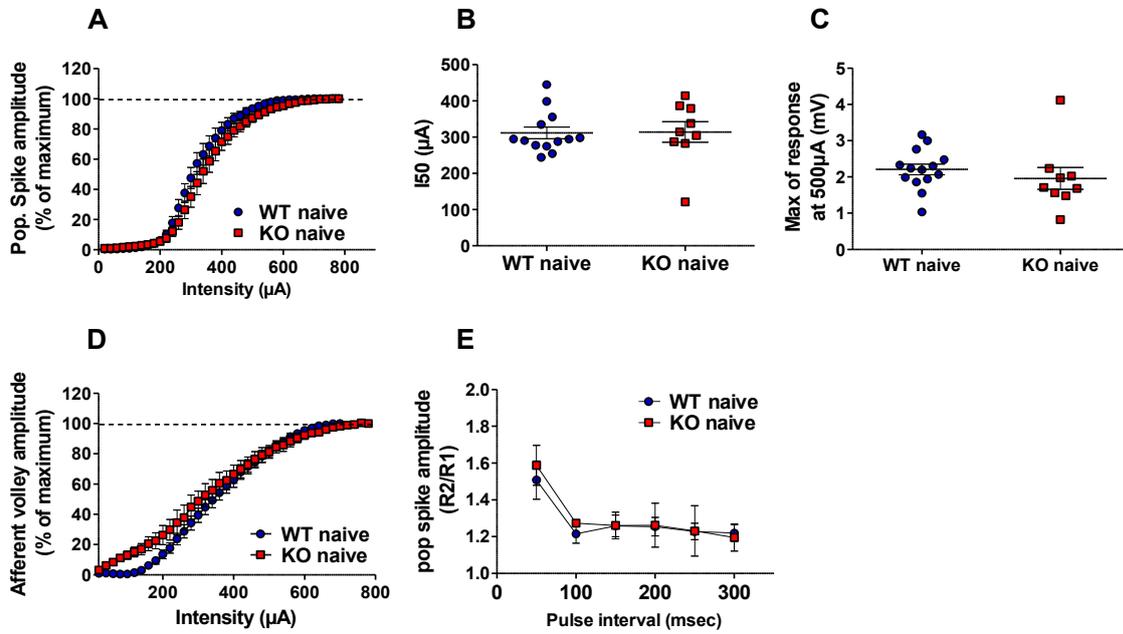


Figure 32: Figure 1: Lack of *hsf2* gene had no effect on CA1 synaptic transmission. **(A)** Input/Output (I/O) curves in WT and HSF2 KO mice were superimposed. **(B)** Stimulation intensity at 50% of the response in the I/O curves was similar in WT and HSF2 KO mice. **(C)** At 600 μA stimulation intensity the same maximal response in WT and HSF2 KO mice was obtained. **(D)** Afferent volley amplitude was larger in KO mice than in WT mice only at low intensity of stimulation. **(E)** There was no change in PPF measurements in HSF2 KO mice compared to WT. Data are shown as mean \pm SEM.

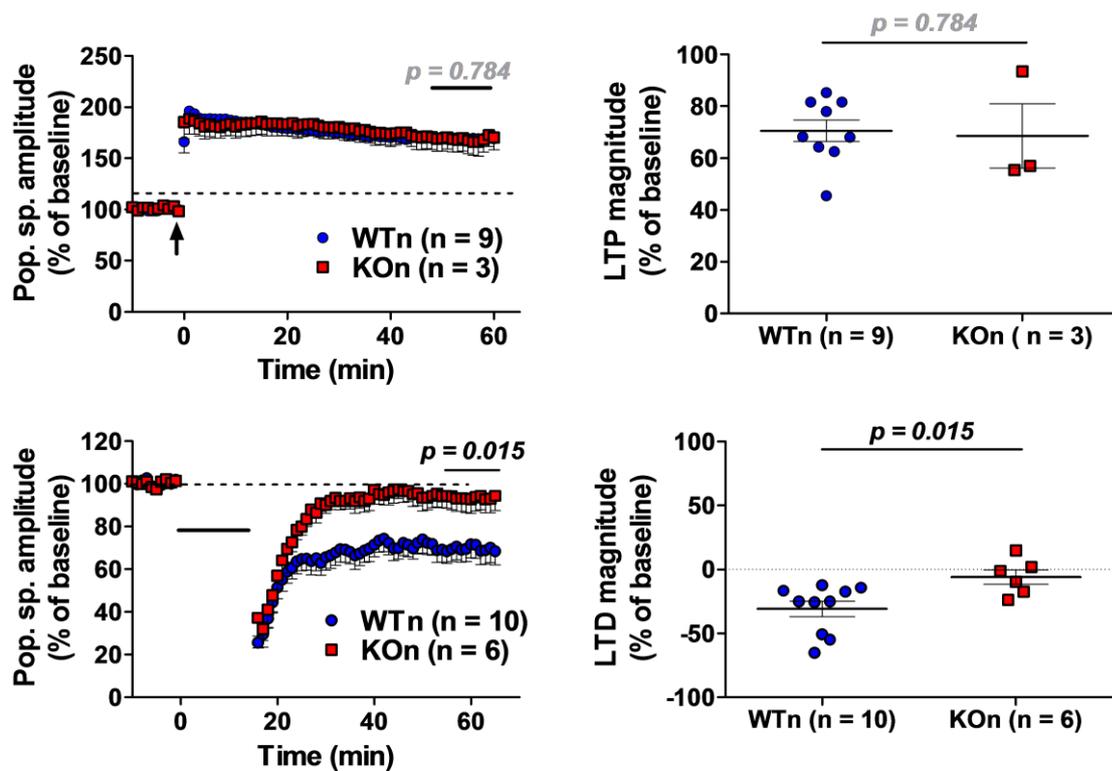


Figure 33: Figure 2: Effect of lack of HSF2 on bidirectional synaptic plasticity. (A1) Long-term synaptic potentiation (LTP) was unaltered in HSF2 KO mice. **(A2)** scatter plot showing the distribution of LTP magnitude in WT and HSF2 KO mice. **(B1)** In contrast, long-term synaptic depression (LTD) was abolished in HSF2 KO mice. **(B2)** Measurements showed that LTD magnitude in HSF2 KO mice was smaller than in WT mice.

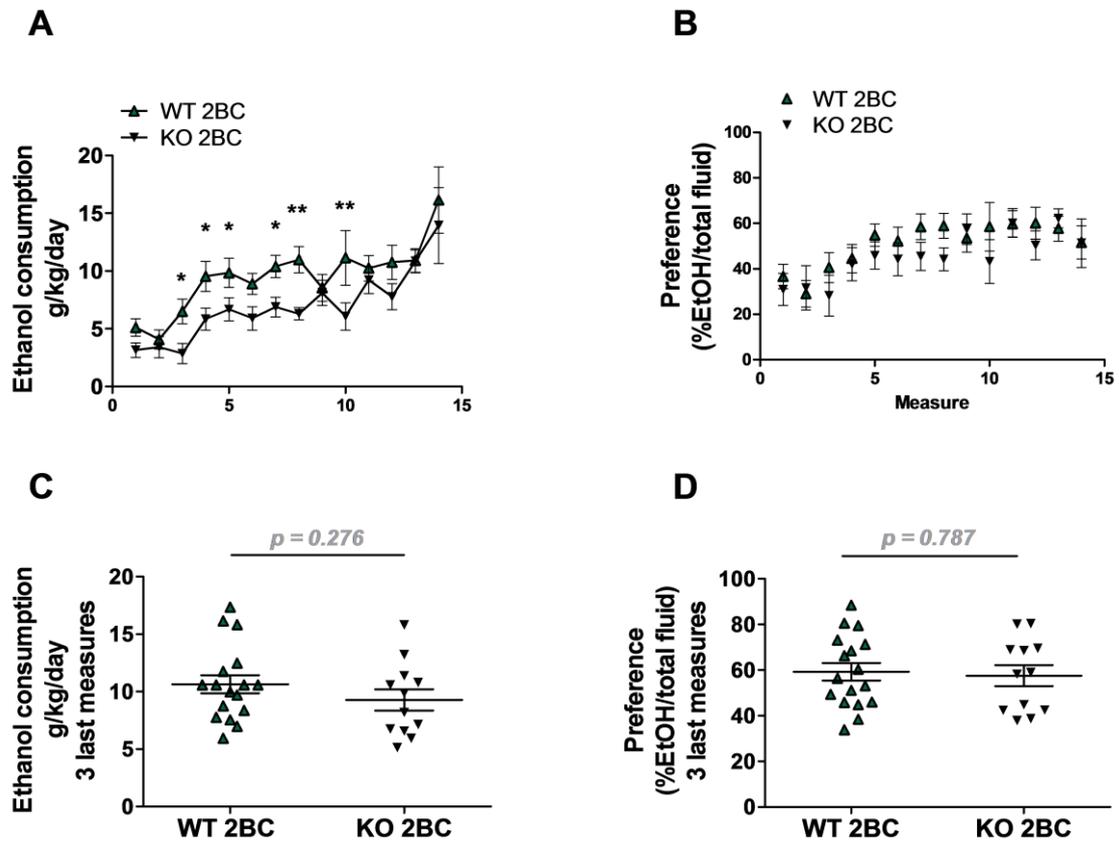


Figure 34: Figure 3: Ethanol consumption and preference. (A) Both animal genotypes showed increase in ethanol consumption along the 2BC procedure with a tendency to be lower in KO animals but only in some measurements. Notably, toward the end of the exposure, difference between populations was barely visible. **(B)** Ethanol preference was not different between populations. **(C)** Average consumption of ethanol during the last three measurements in A showed no differences between populations. **(D)** The same lack of difference was observed regarding preference for ethanol calculated over the last three measurements in B.

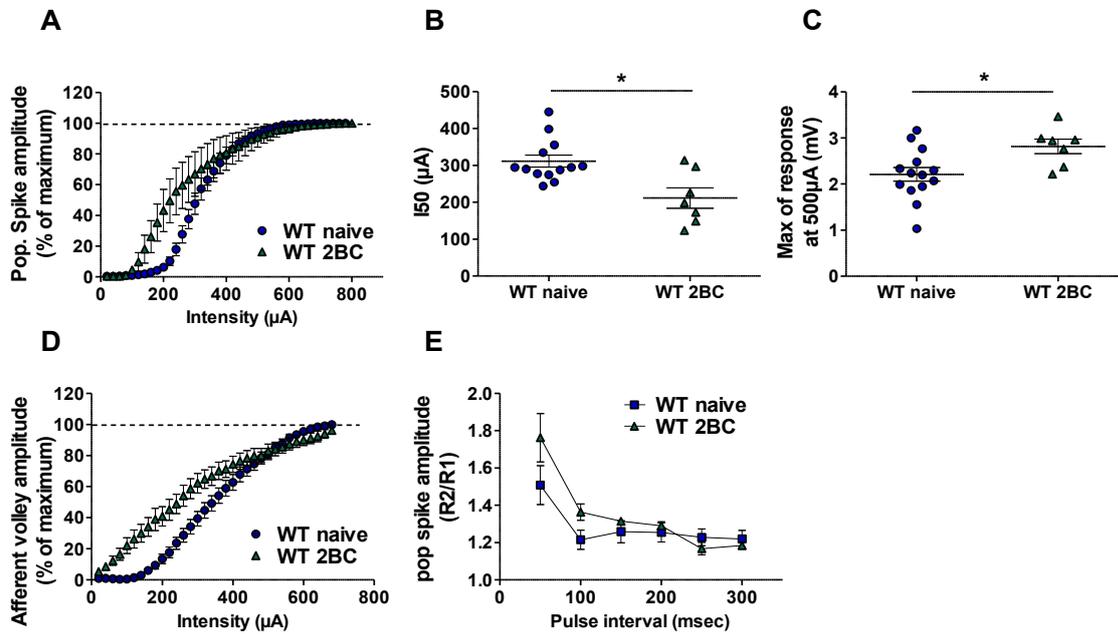


Figure 35: Figure 4: Increased CA1 synaptic transmission in WT mice after ethanol consumption. **(A)** I/O curve for WT 2BC slices was shifted leftward after ethanol consumption compared to WT naive mice. **(B)** Stimulation intensity at 50% of the response was significantly lower after 2BC. **(C)** The maximum response measured was stronger in WT 2BC than in naive WT mice. **(D)** The afferent volley amplitude was higher in WT 2BC animals than in naive WT at almost any tested intensity. **(E)** There was no effect of 2BC on PPF measurements. * $P < 0.05$.

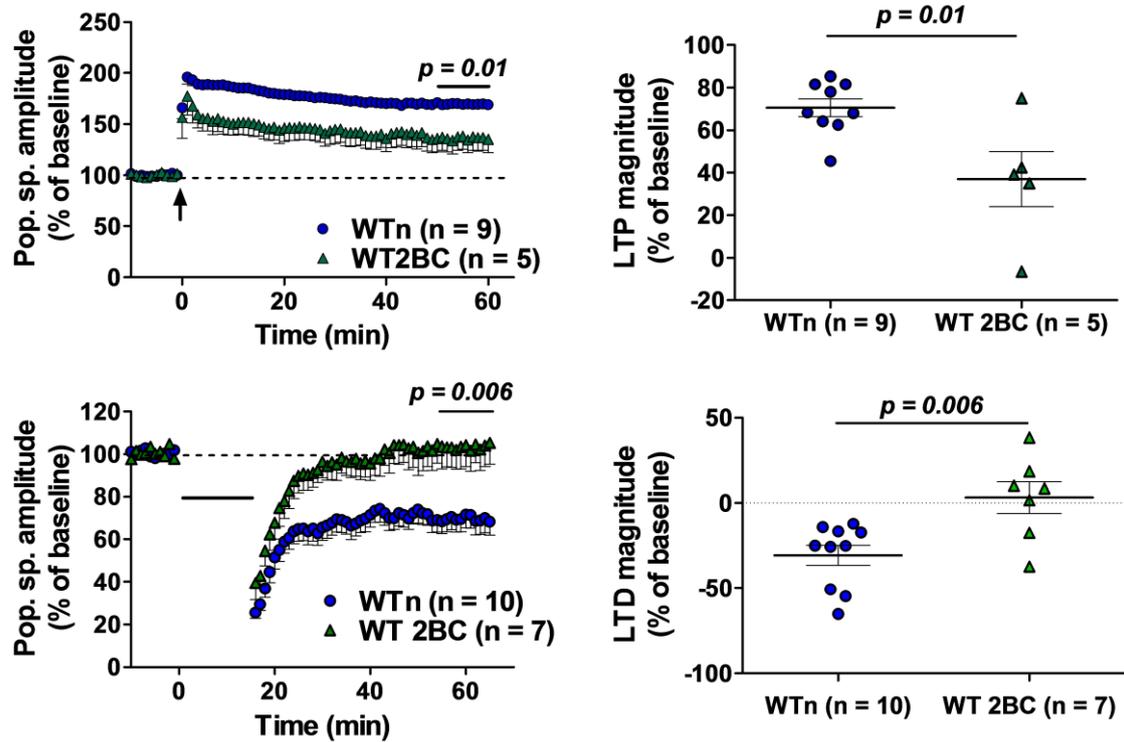


Figure 36: Figure 5: Bidirectional synaptic plasticity in WT mice after ethanol consumption. (A1) LTP was reduced after ethanol consumption. **(A2)** Scatter plot showing no difference in magnitude of LTP in WT naïve and WT 2BC mice. **(B1)** LTD was abolished in WT mice after ethanol consumption. **(B2)** Measurements showed that LTD magnitude was significantly smaller after ethanol consumption than in WT naïve mice.

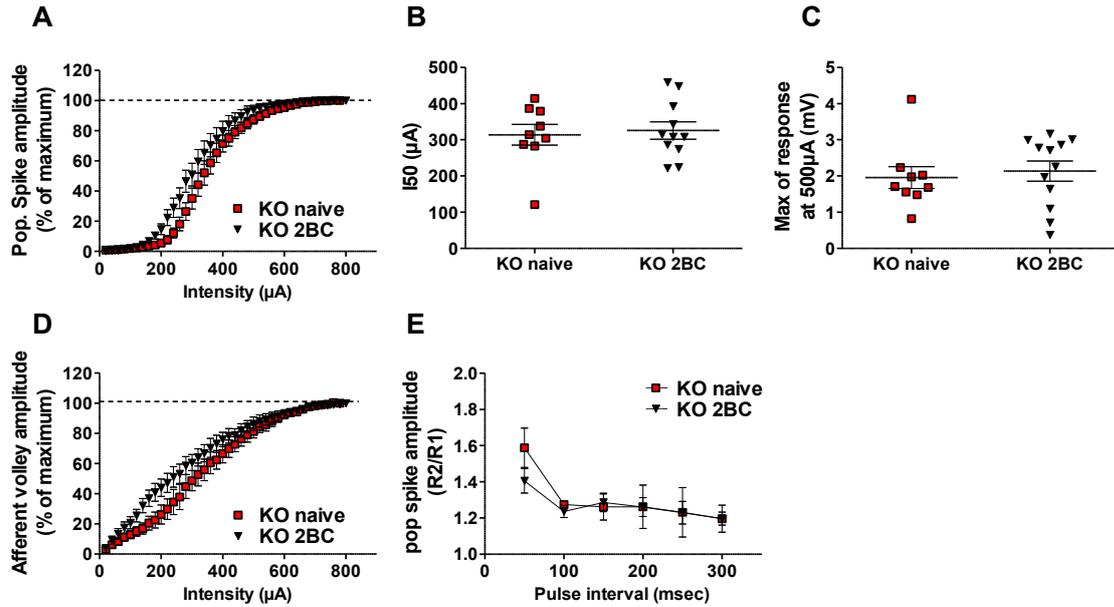


Figure 37: Figure 6: CA1 synaptic transmission in HSF2 KO mice after ethanol exposure. (A) I/O curves performed in KO naïve mice and after ethanol consumption (KO 2BC) were superimposed. (B) No difference in intensity stimulation at 50% of the response in KO naïve mice and after ethanol. (C) The maximum of response was not different between KO naïve and KO 2BC mice. (D) Relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was unchanged after ethanol. (E) There was still no alteration when EPSP slope was analyzed in addition to afferent volley and stimulus intensity. (F) No change in PPF ratio after ethanol consumption.

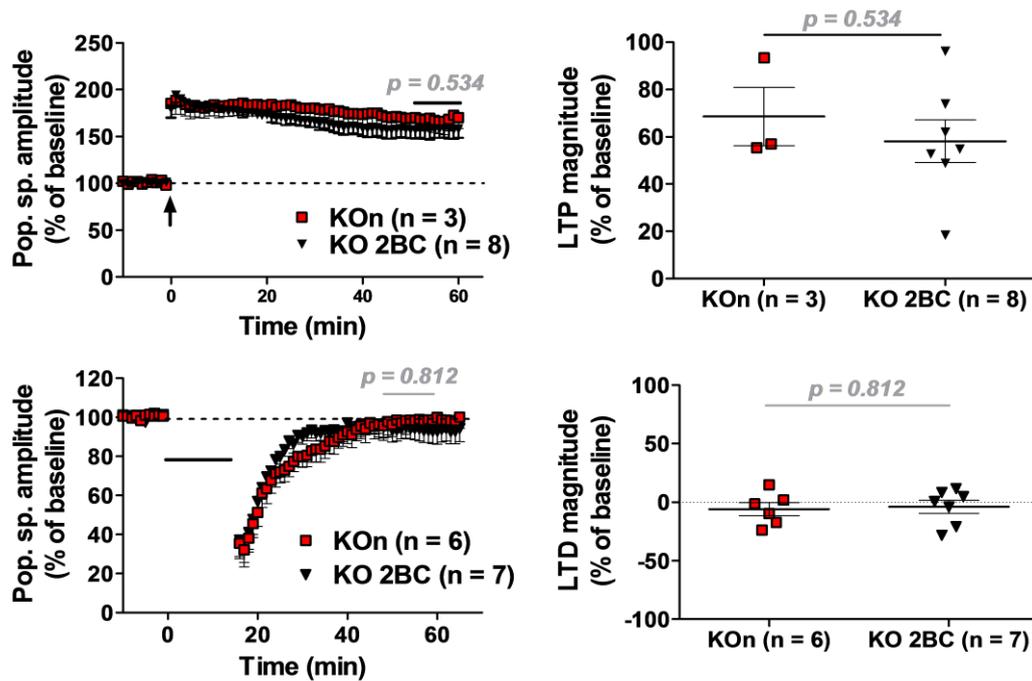


Figure 38: Figure 7: Bidirectional synaptic plasticity in *hsf2*^{-/-} mice after ethanol exposure. (A1) LTP was not affected. (A2) Scatter plot showing no difference in LTP magnitude in KO 2BC mice compared to KO naïve mice. (B1) LTD absent in KO naïve mice remains unaltered after ethanol. (B2) Scatter plot shows that LTD magnitude in KO mice after ethanol consumption was not significantly different from KO naïve mice. * $P < 0.05$. ns is for nonsignificant.

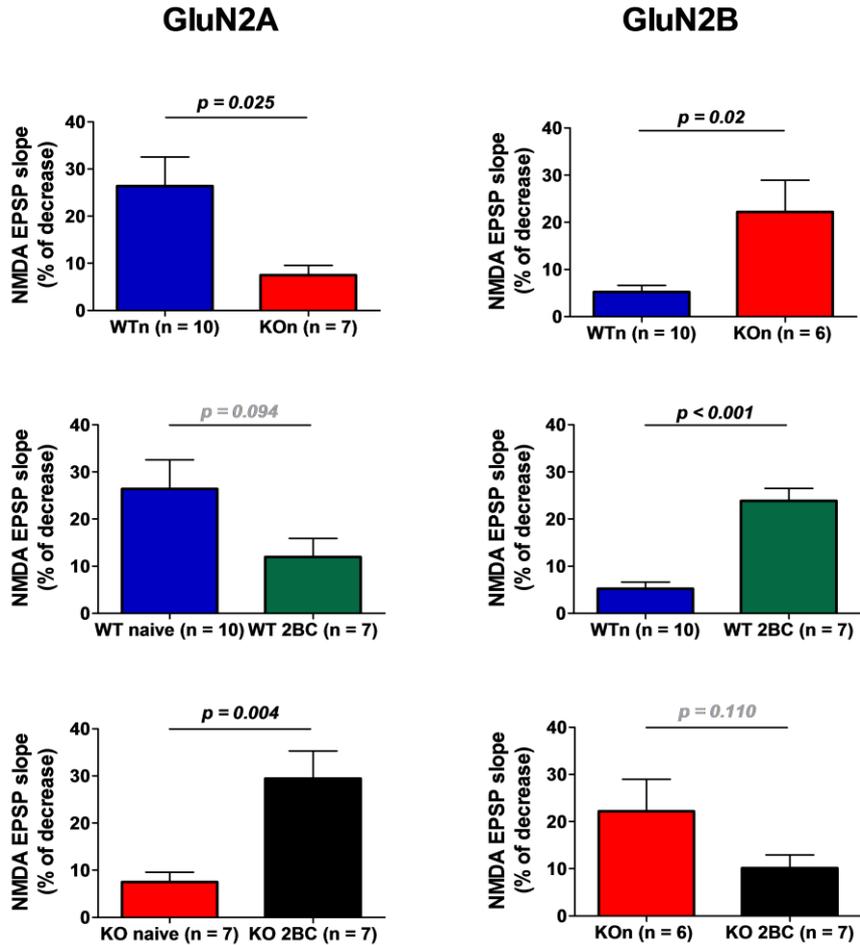


Figure 39: Figure 8: Sensitivity of NMDA-fEPSPs to GluN2A and GluN2B antagonists before and after ethanol. **(A1)** NVP AAM077, an antagonist of GluN2A subunit was more efficient in WT naïve mice than in KO naïve mice. **(A2)** Ro25-66981, a GluN2B antagonist was less efficient in WT naïve mice than in KO naïve mice. **(B1)** After ethanol, WT 2BC animals became less sensitive to GluN2A antagonist whereas this antagonist became more efficient in KO 2BC animals. **(B2)** WT 2BC animals showed an increased sensitivity to GluN2B antagonist after ethanol while KO 2BC lost their sensitivity to Glu2B antagonist after ethanol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

References

- Ahn J, Piri N, Caprioli J, Munemasa Y, Kim SH, Kwong JM. Expression of heat shock transcription factors and heat shock protein 72 in rat retina after intravitreal injection of low dose N-methyl-D-aspartate. *Neurosci Lett.* 2008 ;433:11-6.
- Burnett EJ, Chandler LJ, Trantham-Davidson H. Glutamatergic plasticity and alcohol dependence-induced alterations in reward, affect and cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 ;65:309-20.
- Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Barcellona ML, Rizza V. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cell damage after acute ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:391-7.
- Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Reale S, Barcellona ML, Rizza V. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:1159-67.
- Chang CC, Chen SD, Lin TK, Chang WN, Liou CW, Chang AY, Chan SH, Chuang YC. Heat shock protein 70 protects against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus via inhibition of nuclear factor- κ B activation-induced nitric oxide synthase II expression. *Neurobiol Dis.* 2014; 62:241-9.
- Cozzoli DK, Courson J, Wroten MG, Greentree DI, Lum EN, Campbell RR, Thompson AB, Maliniak D, Worley PF, Jonquieres G, Klugmann M, Finn DA, Szumlinski KK. Binge alcohol drinking by mice requires intact group 1 metabotropic glutamate receptor signaling within the central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39:435-44.
- den Hartog CR, Gilstrap M, Eaton B, Lench DH, Mulholland PJ, Homanics GE, Woodward JJ. Effects of Repeated Ethanol Exposures on NMDA Receptor Expression and Locomotor Sensitization in Mice Expressing Ethanol Resistant NMDA Receptors. *Front Neurosci.* 2017 ;11:84.
- Ekimova IV, Nitsinskaya LE, Romanova IV, Pastukhov YF, Margulis BA, Guzhova IV. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. *J Neurochem.* 2010;115:1035-44.
- El Fatimy R, Miozzo F, Le Mouël A, Abane R, Schwendimann L, Sabéran-Djoneidi D, de Thonel A, Massaoudi I, Paslaru L, Hashimoto-Torii K, Christians E, Rakic P, Gressens P, Mezger V. Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol Med.* 2014;6:1043-61.
- Giza CC, Maria NS, Hovda DA. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma.* 2006;23:950-61.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 18769–18774
- Hager AM, Gagolewicz PJ, Rodier S, Kuo MC, Dumont ÉC, Dringenberg HC. Metaplastic up-regulation of LTP in the rat visual cortex by monocular visual training: requirement of task mastery, hemispheric specificity, and NMDA-GluN2B involvement. *Neuroscience.* 2015;293:171-86.
- Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K. Stressor-like effects of cocaine on heat shock protein and stress-activated protein kinase expression in the rat hippocampus: interaction with ethanol and anti-toxicity drugs. *Leg Med (Tokyo).* 2003;5 Suppl 1:S87-90.
- Hernandez RV, Puro AC, Manos JC, Huitron-Resendiz S, Reyes KC, Liu K, Vo K, Roberts AJ, Gruol DL. Transgenic mice with increased astrocyte expression of IL-6 show altered effects of acute ethanol on synaptic function. *Neuropharmacology.* 2016;103:27-43
- Hopf FW. Do specific NMDA receptor subunits act as gateways for addictive behaviors? *Genes Brain Behav.* 2017;16:118-138.
- Hussein AM, Abbas KM, Abulseoud OA, El-Hussainy EMA. Effects of ferulic acid on oxidative stress, heat shock protein 70, connexin 43, and monoamines in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95:732-742.

- Jin X, Eroglu B, Moskophidis D, Mivechi NF. Targeted Deletion of Hsf1, 2, and 4 Genes in Mice. *Methods Mol Biol.* 2018;1709:1-22.
- Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo TP, Rallu M, Gitton Y, Pirkkala L, Loones MT, Paslaru L, Larney S, Hiard S, Morange M, Sistonen L, Mezger V. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* 2002;21:2591-601.
- Kervern M, Silvestre de Ferron B, Alaux-Cantin S, Fedorenko O, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Aberrant NMDA-dependent LTD after perinatal ethanol exposure in young adult rat hippocampus. *Hippocampus.* 2015;25:912-23.
- Kharlamov EA, Lepsveridze E, Meparishvili M, Solomonina RO, Lu B, Miller ER, Kelly KM, Mtchedlishvili Z. Alterations of GABA(A) and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011;95:20-34.
- Krahl SE, Berman RF, Hannigan JH. Electrophysiology of hippocampal CA1 neurons after prenatal ethanol exposure. *Alcohol.* 1999;17:125-31.
- Lee KM, Coelho MA, McGregor HA, Solton NR, Cohen M, Szumlanski KK. Adolescent Mice Are Resilient to Alcohol Withdrawal-Induced Anxiety and Changes in Indices of Glutamate Function within the Nucleus Accumbens. *Front Cell Neurosci.* 2016 ;10:265.
- Loones MT, Rallu M, Mezger V, Morange M. HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53:179-90.
- Lin YW, Yang HW, Min MY, Chiu TH. Heat-shock pretreatment prevents suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in rat hippocampal CA1 synapses. *Brain Res.* 2004 ;999:222-6.
- Matthews DB, Novier A, Diaz-Granados JL, Van Skike CE, Ornelas L, Mittleman G. Impact of adolescent alcohol use across the lifespan: Long-lasting tolerance to high-dose alcohol coupled with potentiated spatial memory impairments to moderate-dose alcohol. *Alcohol.* 2017;61:33-42.
- Ostling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J Biol Chem.* 2007;282:7077-86.
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.*;14:383-400.
- Schambra UB, Lewis CN, Harrison TA. Deficits in spatial learning and memory in adult mice following acute, low or moderate levels of prenatal ethanol exposure during gastrulation or neurulation. *Neurotoxicol Teratol.*;62:42-54.
- 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;19(1).
- Swartzwelder HS, Park MH, Acheson S. Adolescent Ethanol Exposure Enhances NMDA Receptor-Mediated Currents in Hippocampal Neurons: Reversal by Gabapentin. *Sci Rep.* 2017;7:13133.
- Tang Y, Ye M, Du Y, Qiu X, Lv X, Yang W, Luo J. EGFR signaling upregulates surface expression of the GluN2B-containing NMDA receptor and contributes to long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience.* 2015;304:109-21.
- Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS, Goodson ML, Hong Y, Park-Sarge OK, Sarge KD. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science.* 2005; 307:421-3.
- Yang Y, Feng J, Xu F, Wang J. Piracetam inhibits ethanol (EtOH)-induced memory deficit by mediating multiple pathways. *Brain Res.* 2017;1676:83-90.
- Zare N, Motamedi F, Digaleh H, Khodaghali F, Maghsoudi N. Collaboration of geldanamycin-activated P70S6K and Hsp70 against beta-amyloid-induced hippocampal apoptosis: an approach to long-term memory and learning. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20:309-19.

Discussion

Les travaux de mon doctorat ont consisté à étudier l'effet d'une alcoolisation aigue ou chronique sur la transmission synaptique excitatrice du au R-NMDA et sur la plasticité synaptique dépendante de ce récepteur. Deux études ont fait l'objet de mes travaux de thèse et toutes les deux montrent que l'EtOH induit des modifications de la sensibilité du PPSE-NMDA vis-à-vis des antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur et que cette modification de la sensibilité aux antagonistes était accompagnée d'une diminution significative de l'amplitude de la dépression à long terme (DLT_{NMDA}), mécanisme important pour les processus d'apprentissage et de la mémorisation. Dans la première étude, réalisée chez le rat mâle jeune adulte soumis à deux épisodes de *binge drinking-like*, les résultats confirment les travaux précédents de notre équipe qui montraient que 48 heures après ces deux épisodes, la DLT_{NMDA} était significativement réduite, ce qui s'accompagnait de déficits d'apprentissage (Silvestre de Ferron et al., 2015). Mes travaux montrent, en complément, que ce type d'alcoolisation induit des modifications épigénétiques qui consistent en une augmentation de l'expression et de l'activité de HDAC2 ainsi que d'une diminution d'expression d'ac-H4 dans l'hippocampe. De plus et de manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur HDAC, le NaB, 30 min avant chaque injection d'EtOH, bloquait l'augmentation de HDAC2, prévenait les modifications de sensibilité aux antagonistes du récepteur NMDA ainsi que l'abolition de la DLT_{NMDA} et les déficits d'apprentissages. De fait, cette première étude suggère que 48 heures après deux alcoolisations aigües, les modifications de sensibilité aux antagonistes GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA impliquent des changements épigénétiques.

La seconde étude a eu pour objectif de caractériser les effets d'une alcoolisation chronique sur la transmission synaptique en analysant chez des souris C57Bl/6 femelles adultes sauvages les effets d'une consommation volontaire d'EtOH pendant 1 mois, sur le PPSE-NMDA et sur la plasticité en analysant les effets de l'EtOH sur la DLT_{NMDA} . De manière intéressante, nous avons constaté des résultats similaires à la première étude en ce qui concernait les modifications de la sensibilité du PPSE-NMDA à ses antagonistes GluN2A et GluN2B ainsi que l'amplitude de la DLT_{NMDA} suite à l'exposition chronique à l'EtOH. Dans l'ensemble, ces deux études suggèrent que ces modifications de sensibilité apparaissent quel que soit le mode d'exposition à l'alcool, aigue ou chronique, et quel que soit l'âge de l'animal, adolescent/jeune adulte ou adulte, révélant ainsi une conséquence cellulaire commune à ces

expositions. Sur ces souris, nous avons également examiné le rôle d'un facteur de transcription, HSF2, dans la transmission synaptique basale mais aussi dans les modifications induites par l'exposition chronique à l'EtOH. Ainsi nous avons observé à l'aide de souris transgéniques que l'absence de HSF2 était associée à une absence de la DLT_{NMDA} au niveau de l'hippocampe. Cette absence de DLT_{NMDA} était de plus, et de manière surprenante, accompagnée d'une plus grande sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B comparé à des souris sauvages avec, en plus, une diminution de la sensibilité à un antagoniste de la sous-unité GluN2A. Ce résultat suggère pour la première fois que HSF2 jouerait un rôle dans la régulation de la signalisation synaptique due au R-NMDA et plus particulièrement dans celle liée aux sous-unités GluN2B et GluN2A, mais également, HSF2 aurait un rôle dans la régulation de la plasticité synaptique NMDA-dépendante. Dans la suite de cette étude, nous avons évalué la consommation et la préférence pour l'EtOH de ces souris sauvages et déficientes pour le gène codant pour HSF2 suite à l'alcoolisation chronique. L'évaluation de la consommation et de la préférence d'EtOH n'a pas révélé de différence significative, suggérant que HSF2 n'a pas de rôle prépondérant dans l'expression comportementale de prise de boisson alcoolisée. Néanmoins, l'analyse de la plasticité synaptique après exposition à l'EtOH montre que les souris déficientes pour le gène *hsf2* semblent insensibles aux effets de l'EtOH. En effet, d'une part, nous n'avons pas retrouvé l'augmentation de la transmission synaptique observée chez les souris sauvages après alcoolisation chronique reflétée par un décalage vers la gauche de la courbe I/O, ni l'augmentation de la sensibilité à l'antagoniste GluN2B sur le PPSE-NMDA, et d'autre part, la DLT_{NMDA} , absente avant alcoolisation reste absente après alcoolisation. L'ensemble de ces résultats obtenus sur des souris sauvages et déficientes pour le gène *hsf2* suggèrent donc que HSF2 participe à la réponse du réseau de neurones de l'hippocampe suite à une alcoolisation chronique (comme mesurée chez les souris sauvages) et qui se reflète dans trois paramètres : 1) une augmentation de l'excitabilité, 2) une augmentation de la sensibilité à l'antagoniste de GluN2B et 3) un blocage de la DLT_{NMDA} . En conclusion, l'ensemble de mes travaux de thèse montre que la réponse adaptative du réseau de l'hippocampe à une exposition à l'EtOH, qu'elle soit aiguë ou chronique se traduit par une augmentation de la sensibilité du PPSE-NMDA à un antagoniste GluN2B, une diminution de sa sensibilité à un antagoniste GluN2A et un blocage de la DLT_{NMDA} . Ces modifications dues à l'EtOH impliqueraient des facteurs épigénétiques tels que des HDACs ainsi que des facteurs de transcriptions tels que HSF2.

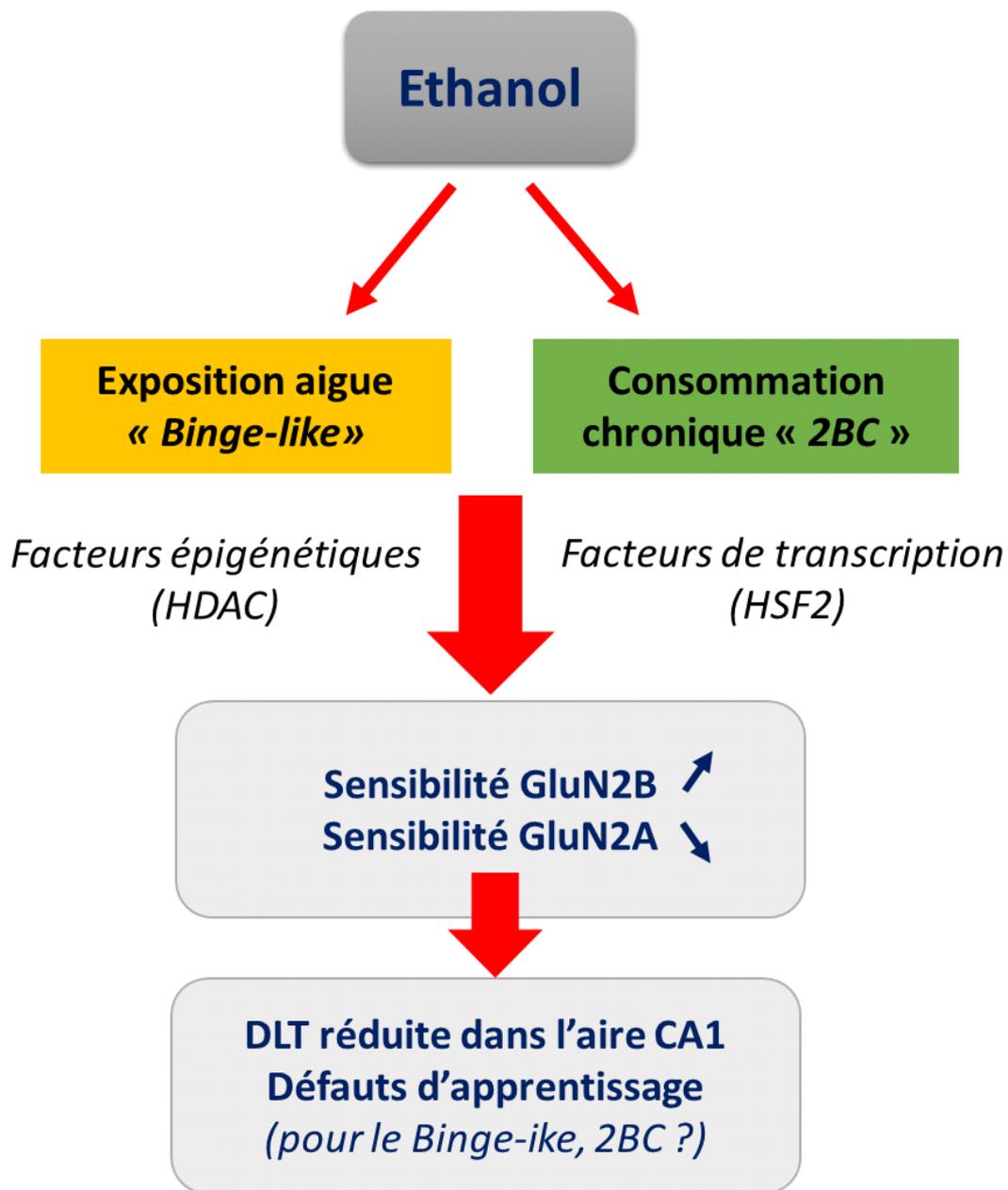


Figure 40: Schéma récapitulatif des principaux résultats de mes travaux de thèse

I. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par l'éthanol

Le point commun entre mes deux études est un changement de sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA aux antagonistes de ses sous-unités GluN2A et GluN2B après exposition à l'EtOH. Tout d'abord, l'analyse de la sensibilité pharmacologique du signal NMDA (PPSE-NMDA) montre qu'avant alcoolisation les animaux, rat jeune adulte et souris sauvage adulte, présentent une plus grande sensibilité à l'antagoniste de la sous-unité GluN2A, le NVP-AAM077 qu'à l'antagoniste GluN2B, le Ro25 6981. Au niveau de l'hippocampe, les sous-unités GluN2 les plus répandues sont GluN2A et GluN2B. Le niveau d'expression de GluN2B est très élevé à la naissance et diminue à l'âge adulte. A l'inverse, la quantité de sous-unité GluN2A augmente avec l'âge (Dumas, 2005; Monyer et al., 1994; Yashiro and Philpot, 2008). Ainsi, nos résultats concernant la sensibilité aux antagonistes GluN2A et GluN2B traduiraient, indirectement, la présence de sous-unités GluN2A plus nombreuses à ces deux âges (jeune adulte et adulte). De manière intéressante, l'exposition à l'EtOH inverse la sensibilité du signal NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B. En effet, nous avons rapporté une augmentation de la sensibilité à l'antagoniste de la sous-unité GluN2B et à l'inverse, une diminution de la sensibilité à l'antagoniste de la sous-unité GluN2A. Concernant la sous-unité GluN2B, une étude antérieure dans notre équipe avait aussi montré que 48 heures après deux épisodes de *binge drinking*, l'antagoniste de la sous-unité GluN2B était plus efficace sur le PPSE-NMDA (Silvestre de Ferron et al., 2015). Ainsi, mes travaux confirment ce résultat et le complète même en indiquant une forte sensibilité à l'antagoniste GluN2A avant EtOH, et qui diminue suite à une exposition à l'EtOH. Notre deuxième étude dans laquelle les souris C57BL/6 ont été alcoolisées pendant un mois, révèle aussi le même résultat ce qui suggère que la sous-unité GluN2B s'adapte de la même façon à l'EtOH dans les deux modes d'alcoolisation. Par contre, nous ne pouvons pas affirmer que ce changement de sensibilité est dû à un changement du niveau d'expression de la sous-unité étudiée. Cependant, de nombreux autres travaux ont démontré une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B après différents types d'expositions à l'éthanol. Les premières études réalisées sur des cultures de neurones d'hippocampe ou de cortex ont indiqué que l'exposition chronique à l'EtOH augmentait l'activité synaptique du récepteur NMDA en ciblant spécifiquement les sous-unités GluN1 et GluN2B (Carpenter-Hyland et al., 2004). Ce résultat a été confirmé dans d'autres régions, notamment au niveau du noyau accumbens, une structure

clé dans les phénomènes de récompense, qui présente aussi une augmentation de la quantité de sous-unité GluN2B après plusieurs injections d'EtOH chez des souris adultes (McGuier et al., 2015). De la même façon, l'exposition chronique à l'EtOH augmente le niveau d'expression de la sous-unité GluN2B dans le cortex préfrontal médian (Kalluri et al., 1998). En ce qui concerne la sous-unité GluN2A, nos études montrent que l'exposition à l'EtOH diminue la sensibilité du signal NMDA à un antagoniste GluN2A. Ce résultat est en mettre en parallèle de l'étude de Survana et de ses collaborateurs qui ont démontré une augmentation de l'internalisation de la sous-unité GluN2A, mais pas de GluN2B au niveau de l'hippocampe après une exposition aiguë à l'EtOH (Suvana et al., 2005). Cependant, ce résultat reste controversé. En effet, une des premières études réalisée visant à étudier l'effet de l'EtOH sur les sous-unités du récepteur NMDA sur des cultures de neurones d'hippocampe n'a pas montré de modification de la quantité de la sous-unité (Carpenter-Hyland et al., 2004). Au niveau du cortex orbitofrontal, une exposition chronique intermittente à l'EtOH tend même à augmenter le courant et la quantité d'ARNm de la sous-unité GluN2A chez des souris mâles C57BL/6 (Radke et al., 2017). La différence des résultats entre cette étude et la nôtre est probablement due aux différents protocoles utilisés et à la structure étudiée. Toutefois, nos résultats ainsi que ceux de la littérature suggèrent globalement un changement de la balance GluN2A/GluN2B en faveur d'une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B sous l'effet d'une exposition à l'EtOH et d'une diminution de l'expression de GluN2A. Du reste, des résultats préliminaires obtenus récemment dans notre équipe montrent que 48 heures après deux épisodes d'alcoolisation aiguë, la quantité d'ARNm de la sous-unité GluN2B est augmentée dans l'aire CA1 de l'hippocampe chez le rat jeune adulte (données en cours d'analyse). Néanmoins et afin de lever toute ambiguïté quant à nos résultats, il serait encore nécessaire de quantifier les niveaux d'expression des protéines des sous-unités GluN2A et GluN2B afin de confirmer les modifications de la balance GluN2A/GluN2B sous l'effet de l'EtOH dans nos protocoles.

Un autre mécanisme à prendre également en considération dans la sensibilité du PPSE-NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B est le fait que l'EtOH agit aussi sur l'état de phosphorylation de ces deux sous-unités. En effet, il est connu que l'EtOH augmente l'activité de la protéine Fyn qui phosphoryle la sous-unité GluN2B induisant ainsi une facilitation à long terme de son activité (Wang et al., 2010). Ainsi, pour la suite de ces travaux,

il serait intéressant d'étudier les états de phosphorylation des sous-unités GluN2A et GluN2B après exposition à l'EtOH en utilisant nos protocoles d'alcoolisation afin d'identifier le site exact de phosphorylation qui participera aux modifications de l'activité de ces sous-unités.

Une autre hypothèse intéressante à envisager, afin de mieux comprendre nos résultats, est la possibilité de diffusion de la sous-unité GluN2B, majoritairement présente dans le site extra synaptique chez l'adulte alors qu'elle se trouve préférentiellement dans le compartiment synaptique pendant les stades précoces de développement. La plus grande sensibilité à l'antagoniste GluN2B pourrait éventuellement s'expliquer par une mobilité accrue des sous-unités GluN2B après exposition à l'EtOH du compartiment extra synaptique vers le compartiment synaptique. Cette possibilité de diffusion a été observée concernant la sous-unité α_4 du récepteur GABA-A. En effet, en utilisant des techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique il a été révélé que la sous-unité α_4 diffuse de la position extra-synaptique vers la position synaptique après alcoolisation chronique intermittente chez le rat (Liang et al., 2006). Cette réorganisation des éléments constitutifs de la synapse, et principalement du récepteur NMDA et de ses sous-unités, serait en faveur de l'hypothèse selon laquelle une exposition à l'EtOH induirait un retour à un état immature de la synapse au niveau de l'hippocampe. Il serait donc intéressant pour prolonger mes travaux de mettre en place des protocoles de mesure de la mobilité des sous-unités GluN2B avant et à la fin d'une exposition à l'EtOH. Pour cela, nous pouvons, par exemple, enregistrer sur des tranches de CA1 le courant synaptique NMDA en présence ou non d'EtOH à 65mM (correspondant à la dose de 3g/kg d'EtOH, injectée *in vivo*). Lors de ces enregistrements nous devons appliquer un antagoniste irréversible du récepteur NMDA, le MK-801 (20 μ M), dont la particularité est de bloquer les récepteurs NMDA ouverts, donc activés. La diffusion à la surface membranaire du récepteur NMDA serait estimée par la cinétique de récupération du courant synaptique après blocage du récepteur par le MK-801. Cette élégante approche pharmacologique a été utilisée par Tovar et ses collaborateurs, ce qui leur a permis d'observer une récupération anormale d'un courant NMDA sur des cultures de neurones d'hippocampe de souris C57Bl/6 âgées de 1 jour et ce seulement 7 minutes après l'application du MK-801. Les auteurs ont pris la précaution de vérifier que cette récupération n'était pas due à une dissociation du MK-801, ni à une néosynthèse du récepteur NMDA mais

qu'elle était bien la conséquence d'une diffusion latérale du récepteur du site extra synaptique vers le site synaptique (Tovar and Westbrook, 2002).

II. L'éthanol induit des altérations des processus épigénétiques

Dans ma première étude concernant l'implication des mécanismes épigénétiques dans la réponse à l'EtOH, nous avons choisi d'injecter une quantité d'EtOH de 3g/kg en se basant sur une étude antérieure de notre équipe (Silvestre de Ferron et al. 2015). L'injection de cette quantité d'EtOH avait conduit à une alcoolémie de l'ordre de 197.5 ± 19 mg/dl (Silvestre de Ferron et al., 2015). L'étude de Silvestre de Ferron a montré qu'une seule injection n'a pas d'incidence sur la DLT_{NMDA} , que les enregistrements aient eu lieu à 24h ou 48h de délai, mais qu'en revanche les altérations de la plasticité synaptique apparaissaient 48 heures suite à deux injections d'EtOH, espacées de 9h. Cette période de 9h était nécessaire pour que l'EtOH soit métabolisé (Carson and Pruett, 1996) et que l'alcoolémie chute jusqu'à 7.9 ± 1 mg/dl chez le rat (Silvestre de Ferron et al., 2015). Ainsi, cette étude a tenté de modéliser au mieux les épisodes répétés de *binges drinking* chez les adolescents qui en général sont espacés de périodes de sevrage. Dans ce contexte, l'étude de Crego a révélé que la plus grande quantité d'alcool consommée chez des jeunes *binge drinkers* espagnols s'effectuait en fin de semaine (Crego et al., 2012) avec un premier épisode le vendredi soir et un deuxième le samedi soir.

Lors de cette étude, nous avons évalué l'effet de ces deux binges sur le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 ainsi que sur le niveau d'expression de HDAC2. Nos résultats montrent que 48 heures après traitement, le niveau d'expression d'ac-H4K12 augmentait significativement dans l'aire CA1 de l'hippocampe. En revanche le niveau d'ac-H3K9 ne changeait pas. Ce dernier résultat est soutenu par l'étude de Kim et Shukla qui ont utilisé une concentration plus élevée d'EtOH (6g/kg) et quantifié les niveaux d'ac-H3K9 dans différents organes. Ces auteurs n'ont pas observé de changement d'ac-H3K9 dans le cerveau. En revanche, l'augmentation d'ac-H3K9 a été localisée dans le foie, les poumons et dans la rate (Kim and Shukla, 2006) ce qui conduit à supposer que l'éthanol n'agit pas de la même manière dans tous les tissus. A l'opposé, une exposition chronique à l'EtOH pendant 14 jours à raison de 5g/Kg (EtOH 25%) chez le rat induit une diminution d'ac-H3K9 et ac-H3K14 au niveau cortical (Bohnsack et al., 2018). Ces observations suggèrent que le site K12 de l'histone

H4 pourrait être régulé par une exposition aigue à l'EtOH au niveau cérébral ce qui ne serait pas le cas pour le site K9 de l'histone H3. Rappelons que les mécanismes d'acétylation et de désacétylation des histones sont des phénomènes miroirs. De ce fait, la diminution d'ac-H4K12 observée 48 heures après deux épisodes de *binge drinking* pourrait être due à l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de HDAC. Dans nos travaux, l'analyse de HDAC2, l'enzyme qui désacétyle l'histone H4, montre que le niveau d'expression de cet enzyme ainsi que son activité sont augmentés 48 heures après deux injections d'EtOH. Ce même résultat a été observé chez des souris transgéniques déficientes pour le gène codant pour HDAC2 (*hdac2^{-/-}*) qui montrent une augmentation de l'expression de ac-H4K12 et de ac-H4K5 mais pas de ac-H3K14 (Guan et al., 2009). D'autres études ont permis d'établir une relation entre une exposition à l'EtOH et des modifications épigénétiques de type acétylation dans l'hippocampe. Par exemple, l'étude de Sakharkar et ses collaborateurs en 2016 a montré que huit injections i.p. d'EtOH chez le rat jeune (âgé de 28 à 41 jours) induisaient une augmentation de tous les HDACs ainsi qu'une diminution d'acH3K9 dans les aires CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe observés à l'âge adulte (Sakharkar et al., 2016). Une autre étude a montré que 6 heures après une injection d'EtOH à raison de 3g/kg chez la souris induisait une augmentation de acH3K9 et de acH14 dans l'hippocampe alors que l'expression de HDAC2 était diminuée dans le cortex (Finegersh and Homanics, 2014). De même, l'exposition des cultures organotypiques d'hippocampe à différentes concentrations d'EtOH induit des modifications épigénétiques, notamment une diminution de HDAC1 et de HDAC4, qui participent à la régulation de la protéine « *High-mobility group box1* » (HMGB1) en la désacétylant ce qui permet sa liaison à la chromatine. En revanche, la forme acétylée de HMGB1 est exportée dans le milieu extérieur où elle joue le rôle d'une cytokine proinflammatoire. Par conséquent, la diminution de l'activité HDAC1 et HDAC4, sous l'effet de l'EtOH, est associée à une augmentation de HMGB1 dans le milieu extracellulaire. Ainsi HMGB1 déclencherait une réponse neuroinflammatoire en activant les récepteurs « *Toll-like receptors 4* » (TLR4) situés au niveau de la microglie (Zou and Crews, 2014). Outre l'hippocampe, une autre étude réalisée chez des rats adultes qui ont subi une exposition aigue à l'EtOH pendant l'adolescence a montré que la quantité des HATs de type p300 et CBP était faible, ce qui diminuait ainsi l'expression de CREB (Zhang et al., 2018). Les acH3K9 et acH3K14 diminuaient aussi dans certains promoteurs de gènes au niveau de l'amygdale. Ces

observations suggèrent que les modifications épigénétiques induites après une exposition à l'EtOH pendant l'adolescence persistent jusqu'à l'âge adulte (Zhang et al., 2018).

Nos travaux sont donc en accord avec ces études montrant une variation des processus épigénétiques 48 heures suite à deux injections d'EtOH chez le rat jeune adulte. Ces variations consistent en une augmentation de HDAC2 au niveau de l'hippocampe accompagnée d'une diminution d'acH4K12 dans la région CA1. L'ensemble des études montrent que l'exposition chronique à l'EtOH fait varier la balance acétylation / désacétylation des histones, par contre elles n'aboutissent pas toutes à un même résultat qui montrerait que l'exposition aigue à l'EtOH augmente le niveau d'acétylation ou de désacétylation des histones. Une grande variabilité a été observée dans la littérature concernant les niveaux d'expression des HDACs et des HATs. D'autre part, la grande majorité des travaux, y compris les nôtres, se sont consacrées à l'étude de la classe1 des HDACs et montrent toutes une variation des niveaux des HDACs. Cependant elles ne sont pas toutes d'accord sur le type de variation observées. Cette variabilité des résultats peut naturellement être due aux différentes conditions expérimentales utilisées, la souche de l'animal, son âge mais aussi la concentration d'EtOH utilisée et le moment de l'analyse suite à l'exposition aigue. Les modifications épigénétiques ont été aussi observées suite à une exposition prolongée à l'EtOH. Par exemple, suite à une exposition à l'EtOH pendant 16 jours de rats jeunes adultes, le niveau d'acH3K27 au niveau du promoteur du gène codant pour la protéine fmr1 augmente. De manière intéressante, cette modification épigénétique a été associée à une diminution de la densité des épines dendritiques et à des altérations de leur morphologie au niveau de l'hippocampe (Mulholland et al., 2018), suggérant une altération des propriétés de plasticité synaptique. Outre l'hippocampe, l'EtOH en exposition chronique induit aussi des modifications épigénétiques dans d'autres structures cérébrales. Par exemple, une étude antérieure au sein de notre laboratoire avait montré qu'après sept jours de sevrage suite à une exposition à l'EtOH pendant dix jours chez des souris, le niveau d'activité des HDACs était réduit et la quantité d'ac-H4K12 était augmentée au niveau du striatum. L'ensemble de ces observations suggère que quel que soit le type d'exposition ou la structure cérébrale étudiée, l'EtOH induit des modifications épigénétiques en affectant la balance acétylation / désacétylation des histones. Cette idée est renforcée par notre étude dans laquelle nous avons montré que l'inhibition de HDAC2 à l'aide de sodium butyrate (NaB) injecté 30 minutes avant l'EtOH, permettait de

prévenir les effets de l'EtOH sur les apprentissages et la plasticité synaptique au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe, suggérant un lien entre niveau d'HDAC, niveaux d'acétylation et plasticité synaptique. Cependant, ce message est forcément tempéré par le fait que le NaB est un inhibiteur non-sélectif des HDACs de la classe I. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun inhibiteur sélectif des HDACs à disposition des chercheurs. Ainsi les conclusions de notre étude restent limitées d'autant plus que d'autres HDACs de la classe I semblent aussi impliqués dans les processus de mémorisation tel que HDAC3. En effet, l'absence de HDAC3 permet d'améliorer la plasticité synaptique et les apprentissages (Shu et al., 2018). Il serait donc important de quantifier également HDAC3 dans notre modèle de *binge drinking* chez le rat jeune. De ce fait, dans notre contexte d'étude et pour renforcer nos résultats, il serait judicieux de cibler uniquement HDAC2 en utilisant une autre méthode d'inhibition telle que l'utilisation de siRNA anti-HDAC2 et examiner les effets de cette inhibition sélective sur les apprentissages et la plasticité synaptique. Une autre limite à prendre en considération est que nous ne fournissons pas de preuves directes d'une régulation de la balance GluN2A/GluN2B par HDAC2 particulièrement. Il faudra donc, d'une part montrer les taux d'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B 24h après deux épisodes de *binge-drinking* ainsi que l'effet combiné de l'EtOH et du NaB sur cette balance, et d'autre part mesurer la liaison de HDAC2 aux promoteurs des gènes codants pour les sous-unités GluN2A et GluN2B par co-immunoprécipitation de la chromatine (Chip).

III. HDAC et mémoire

L'évaluation des performances mnésiques dans un test de reconnaissance de nouvel objet 48 heures après deux épisodes de *binge drinking* chez le rat jeune adulte révèle une diminution des capacités de l'animal à reconnaître le nouvel objet, ce qui sous-tend un déficit d'apprentissage. Ce résultat est en accord avec les travaux précédents de notre équipe (Silvestre de Ferron et al., 2015). Obtenus sur une cohorte d'animaux différents et à distance de l'étude précédente, nos mesures présentes révèlent la répétabilité et donc la robustesse de ce résultat concernant les effets de deux binges. De manière intéressante, l'injection de NaB 30min avant chaque épisode de *binge drinking* prévenait les effets de l'EtOH sur les performances d'apprentissage. A noter que notre démarche lors de cette étude est bien

d'ordre préventif, puisque nous avons souhaité bloquer les effets de l'EtOH avant qu'ils ne se produisent et non pas à corriger les conséquences des épisodes de *binge drinking*. Dans ce cadre, nos résultats suggèrent que le NaB, inhibiteur des HDACs de la classe I, empêche les réactions de désacétylation de la chromatine induites par l'EtOH ce qui permettrait de préserver les performances de l'animal alcoolisé dans un test de reconnaissance de nouvel objet. D'autres études ont également établi un lien entre les HDACs de la classe I et les performances mnésiques. En ce qui concerne HDAC2, l'étude de Guan et de ses collaborateurs montrent qu'une surexpression des HDAC2 est associée à une perturbation de la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe et à une diminution des performances mnésiques (Guan et al., 2009), ce qui corrobore tout à fait avec nos résultats. Ces auteurs ont aussi montré que l'inhibition de HDAC2 tout comme l'inactivation du gène *hdac2* améliorent la plasticité synaptique et la mémoire, ce qui, à nouveau renforce nos résultats obtenus après injection de NaB. De plus, une augmentation des niveaux de HDAC2 a été observée dans un modèle de vieillissement associée à des troubles de la mémoire (Singh and Thakur, 2018). Rappelons que nos résultats montrent une augmentation de HDAC2 associée à une réduction significative de la DLT et à un déficit d'apprentissage. Nos résultats sont donc en accord avec la littérature qui démontre que HDAC2 joue un rôle important dans les altérations de la plasticité synaptique et dans les processus d'apprentissage. Cependant, nous avons utilisé un inhibiteur non sélectif de HDAC2 ce qui ne nous permet pas d'affirmer que HDAC2 est le seul responsable des perturbations de la plasticité et de la mémoire observées 48 heures après les deux injections d'EtOH. Le NaB est un inhibiteur des HDACs de la classe I, il serait donc important de regarder l'effet de l'inhibition des HDACs de la classe I sur les processus d'apprentissage. En s'appuyant sur la littérature, nous notons que l'inhibition des HDACs de la classe I, d'une manière générale par la TSA ou le MS275, améliore la reconnaissance et la localisation d'un nouvel objet chez la souris C57Bl/6 (Hawk et al., 2011). Une autre étude montre que l'inhibition de ces HDACs améliore la mémoire chez un modèle murin de dégénérescence neuronale et de perte de mémoire spatiale en augmentant le nombre d'épines dendritiques et de synapses au niveau de l'hippocampe (Fischer et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition des HDACs de la classe I par la TSA s'avère aussi augmenter l'apprentissage dans le cadre d'un conditionnement aversif (Monsey et al., 2011). Ainsi, il est probable que l'ensemble des HDACs de la classe I soit impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

Il est important de mentionner que l'effet de l'inhibition des HDACs sur les apprentissages et la mémoire pourrait impliquer une combinaison des modifications de la chromatine et des modifications de protéines autres que les histones. En effet, des études montrent que les HDACs agissent aussi les facteurs de transcription de type Stat1, Stat3 et Sp1 (Yuan et al., 2005) ou encore sur des protéines de cytosquelette comme l' α tubuline. Néanmoins, nous avons confirmé nos résultats obtenus avec le NaB en utilisant un autre inhibiteur des HDACs, la TSA, qui a aussi permis de restaurer un niveau de DLT comparable à celui observé chez les animaux contrôles, 48 heures après deux épisodes de *binge drinking*.

On peut également noter que nos résultats révèlent que l'injection du NaB seul n'a pas d'effet sur la plasticité synaptique et les apprentissages. De la même façon, l'injection de TSA ne présente pas d'effet sur la plasticité. Ceci est en accord avec la littérature, puisqu'aucune perturbation de la plasticité synaptique et des apprentissages n'a été observée après l'administration d'un inhibiteur HDAC seul. Cette constatation nous conduit à supposer que les inhibiteurs HDACs pourraient être utilisés chez l'Homme afin de traiter des perturbations mnésiques dus à la consommation d'EtOH. Ceci est d'autant plus envisageable que les inhibiteurs HDACs sont déjà utilisés chez l'Homme dans le cadre d'un traitement de certains cancers parce que ces substances sont capables d'induire une apoptose des cellules tumorales (Khan and La Thangue, 2012; Penney and Tsai, 2014). Encore une fois, je tiens à préciser que le problème de l'utilisation des inhibiteurs HDACs est qu'ils ne sont pas sélectifs et que le développement de molécules ciblant spécifiquement chaque HDAC reste nécessaire.

IV. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par les HDACs

Notre étude montre que la sensibilité du récepteur NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B est modulé sous l'effet de l'EtOH ce qui pourrait indirectement indiquer une modulation de l'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B. L'inhibition des HDACs empêche ces effets de l'EtOH sur cette modulation de sensibilité pharmacologique suggérant ainsi que l'EtOH fait intervenir des mécanismes épigénétiques de type désacétylation des histones. Nos résultats montrent aussi que l'EtOH augmente le niveau d'activité et d'expression de HDAC2. Nous pouvons donc suggérer que l'augmentation de HDAC2 participerait à la modulation de la sensibilité des sous-unités GluN2A et GluN2B. Le lien entre

l'activité HDAC et la modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B a été démontré dans l'hippocampe par Guan et al (2009). En effet, une surexpression de HDAC2 a été associée à une diminution de la quantité de l'expression des sous-unités GluN2A et GluN2B, et à l'opposé, les souris déficientes pour le gène *hdac2* présentaient une augmentation de l'expression de ces sous-unités (Guan et al., 2009). Ainsi, l'augmentation de HDAC2 dans nos travaux après l'exposition à l'EtOH serait responsable d'une augmentation de l'expression de GluN2B. D'autre part, l'inhibition de HDAC2 dans un modèle du syndrome autistique, augmente le niveau d'expression de GluN2A dans le cortex préfrontal (Qin et al., 2018). Cependant, le lien entre l'augmentation de HDAC2 et la sensibilité du signal NMDA à antagoniste de la sous-unité GluN2B est moins clair. Une étude a mis en évidence un lien indirect entre HDACs et l'expression de cette sous-unité du récepteur NMDA via un mécanisme dépendant de la protéine CREST (Ca²⁺ responsive transactivator). En effet, lorsque le neurone est au repos, le faible niveau de Ca²⁺ dans le milieu intracellulaire permettrait l'activation de la protéine rétinoblastome (Rb) qui se lie aux HDACs, ainsi le complexe formé inactive la protéine CREST et inhibe l'expression de la sous-unité GluN2B (Qiu and Ghosh, 2008). D'autre part, l'inhibition des HDACs par le vorinostat augmente l'expression de la sous-unité GluN2B (Fujita et al., 2012). Par conséquent, l'augmentation de la sensibilité du signal NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B pourrait être dû à l'augmentation de l'activité HDAC2 ou bien à des modifications de la protéine sans pour autant moduler son niveau d'expression. Par exemple, des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ou encore la diffusion de la sous-unité GluN2B du site extra synaptique vers le site synaptique que j'ai déjà exposé participeraient à ces résultats. Afin de clarifier le lien entre HDAC2 et les sous-unités GluN2A et GluN2B, il serait important de réaliser une immunoprécipitation de chromatine de l'ensemble de ces protéines.

V. Modulation des sous-unités GluN2A et GluN2B par les HSFs

Nous avons montré que le signal NMDA enregistré dans l'aire CA1 des souris *hsf2*^{-/-} est plus sensible à un antagoniste de la sous-unité GluN2B par rapport à un antagoniste de la sous-unité GluN2A. Ce résultat est à l'opposé de ce que nous avons obtenu chez les souris sauvages naïves. Ceci suggère, pour la première fois, un lien possible entre HSF2 et GluN2B. Cependant,

le rôle exact de HSF2 dans la régulation de la sous-unité GluN2B n'a jamais été établi. Nous suggérons que probablement l'expression des HSPs sous le contrôle de HSF2 participerait à la régulation de l'expression de la sous-unité GluN2B, mais une nouvelle fois, nous n'avons pas mesuré les taux d'expression de GluN2B chez ces souris déficientes pour HSF2. D'autres études ont permis de mettre en évidence le rôle de HSF1, plus étudié que HSF2, dans la régulation des protéines synaptiques telle que SAP97, synapsine I, synaptophysine et PSD95 (Hooper et al., 2016). Il est bien connu que la protéine PSD95 joue un rôle important dans le trafic et la stabilisation du récepteur NMDA au niveau de la membrane cellulaire et que la perturbation de l'expression de cette protéine induit une dérégulation du récepteur NMDA (Coley and Gao, 2018). Ainsi, nous suggérons que HSF2, tout comme HSF1, pourrait participer à la régulation du récepteur NMDA en modulant l'expression de la protéine PSD97. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier la protéine PSD97 chez les souris *hsf2*^{-/-} au niveau des neurones pyramidaux de l'aire CA1.

Après un mois d'alcoolisation suivi d'une semaine de sevrage, nos résultats montrent que la sensibilité du PPSE-NMDA devient plus grande pour l'antagoniste GluN2B chez les souris sauvages et plus faible pour l'antagoniste GluN2A, alors que les souris *hsf2*^{-/-} montrent l'inverse. Ceci suggère une modification de la réponse cellulaire à l'EtOH chez les souris *hsf2*^{-/-}. L'étude d'El Fatimy et ses collaborateurs a permis d'indiquer que HSF2 joue le rôle d'un senseur au stress cellulaire induit par une alcoolisation fœtale. De manière intéressante, ces auteurs ont montré que HSF2 interagit avec HSF1 pour former un complexe spécifique qui perturbe l'expression de protéines impliquées dans la migration cellulaire, ce qui provoque des défauts de migrations corticales chez la souris (El Fatimy et al., 2014). Ainsi, en absence de HSF2, la réponse à l'EtOH n'implique que HSF1 dont l'expression augmente sous l'effet de l'EtOH (Pignataro et al., 2007). Nous pouvons alors supposer que les modifications de la sensibilité du PPSE-NMDA dans notre étude chez la souris mature pourraient être dues à l'absence du complexe HSF2-HSF1 et que dans ce cas, HSF1 seul pourrait induire une réponse cellulaire différente de celle induite en présence de HSF2.

VI. La transmission glutamatergique en absence de HSF2 ou après alcoolisation

Nos résultats montrent que l'absence de HSF2 n'a pas d'incidence sur la transmission glutamatergique dans l'aire CA1. Ceci est reflété par une superposition des courbes I/O des souris *hsf2*^{-/-} et des souris sauvages. De la même manière, la relation entre l'amplitude de la volée afférente et la pente du PPSE_{NMDA} ne montre pas de différences entre les deux génotypes. De plus, l'analyse des PPFs à différents intervalles ne présente aucune différence entre les souris *hsf2*^{-/-} et les souris sauvages. L'ensemble de ces analyses montre que la délétion du gène *hsf2* ne modifie pas la transmission glutamatergique basale. Après alcoolisation, nous avons analysé ces différents paramètres concernant la transmission synaptique chez les souris sauvages. Ces analyses ont abouti à un résultat important montrant que l'exposition à l'EtOH via un protocole d'alcoolisation volontaire à double choix pendant un mois et suivi d'une semaine de sevrage, modifie la transmission glutamatergique. En effet, la courbe I/O, reflétant l'excitabilité intrinsèque du réseau hippocampique, se décale vers la gauche ce qui signifie que pour une même intensité de stimulation électrique, la réponse neuronale est plus importante après alcoolisation comparé à la condition contrôle. Cette augmentation de l'excitabilité pourrait être due à plusieurs facteurs, à commencer par une augmentation de la libération présynaptique du glutamate. Or, l'analyse des PPFs montre une tendance à l'augmentation de la libération présynaptique mais sans être statistiquement significatif. Ainsi, nous rejetons l'hypothèse d'une augmentation de la libération présynaptique du glutamate dans le réseau hippocampique. Ce résultat confirme d'autres études réalisées auparavant dans notre équipe utilisant d'autres modes d'alcoolisation tel que le modèle de *binge drinking* ou le modèle d'alcoolisation fœtale. Ces études ne montraient pas de modifications de la libération présynaptique du glutamate suite à une exposition à l'EtOH (Kervern et al., 2015; Silvestre de Ferron et al., 2015). Une autre possibilité concerne cette fois l'équipement membranaire en position post-synaptique. Rappelons que la sensibilité pharmacologique du PPSE_{NMDA} devient plus grande pour l'antagoniste GluN2B après alcoolisation comparé à l'antagoniste GluN2A suggérant une nouvelle fois que probablement l'EtOH induit une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B. Notons que la sous-unité GluN2B possède une cinétique d'inactivation plus lente par rapport à la sous-unité GluN2A ce qui pourrait être responsable d'une plus grande entrée de calcium dans l'élément post-synaptique (Strack and Colbran, 1998) et donc une plus grande dépolarisation du neurone. Ceci pourrait participer à l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Afin de compléter ce résultat, il serait intéressant d'isoler et d'enregistrer le courant NMDA et

d'analyser ses propriétés biophysiques et sa sensibilité pharmacologique aux antagonistes GluN2A et GluN2B. Un autre résultat très important est que les souris *hsf2*^{-/-} ne présentaient aucune modification de la transmission synaptique après alcoolisation suggérant que la délétion du gène *hsf2* rend les souris insensibles aux effets de l'EtOH sur la transmission glutamatergique dans l'aire CA1. Malgré les limites énoncées à notre étude, celle-ci reste, à notre connaissance, la première à mettre en évidence une implication du facteur HSF2 dans les réponses à l'EtOH en termes d'excitabilité du réseau hippocampique. Cependant le mécanisme exact reste encore à explorer.

VII. Perturbation de la DLT : rôle de la métaplasticité

Nos résultats montrent que le *binge drinking* diminue significativement l'amplitude de la DLT_{NMDA} chez les rats jeunes adultes. De la même manière, une alcoolisation prolongée chez des souris adultes induit une abolition de la DLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe chez des souris C57Bl/6 sauvage. De plus, la délétion du gène *hsf2* abolie à son tour l'induction de la DLT. Par conséquent, les différents modèles utilisés lors de ma thèse présentent tous la même perturbation de la DLT. Un autre point commun entre les différents modèles concerne la modification de la sensibilité pharmacologique du signal NMDA à des antagonistes GluN2A et GluN2B. Le PPSE-NMDA devient plus sensible à un antagoniste de la sous-unité GluN2B et à l'inverse, il devient moins sensible à un antagoniste de la sous-unité GluN2A suite à deux épisodes de *binge drinking* chez les rats jeunes adultes, ou suite à une alcoolisation prolongée chez les souris adultes sauvages ainsi que sous l'effet de la délétion de *hsf2*. Ces observations suggèrent que les quantités de protéines des sous-unités GluN2A et GluN2B pourraient être modifiées dans les différentes conditions en faveur d'une augmentation de la quantité de la sous-unité GluN2B et d'une diminution de l'expression de GluN2A. C'est pourquoi il nous semble pertinent de tenter une interprétation fonctionnelle de nos résultats en nous référant aux travaux théoriques de Bienenstock, Cooper et Munro. Ces travaux stipulent que lorsque le ratio GluN2A/GluN2B est faible, il est plus difficile d'induire une DLT car la sous-unité GluN2B est plus perméable au Ca²⁺ et elle interagit davantage avec l'enzyme CaMKII comparé à la sous-unité GluN2A (Paoletti et al., 2013; Yashiro and Philpot, 2008). Ainsi, les différents modèles que j'ai utilisé durant ma thèse révéleraient une diminution dans l'aire CA1, du ratio

GluN2A/GluN2B augmentant alors l'entrée de calcium dans l'élément post-synaptique ainsi que l'interaction avec la protéine CaMKII ce qui décale la courbe BCM (Bienenstock-Cooper-Munro) vers la gauche en augmentant le seuil θ du déclenchement de la DLT. Bien évidemment, afin d'appliquer ce modèle à la DLT, il faut s'assurer que cette forme de plasticité est dépendante du récepteur NMDA. Effectivement, le blocage du récepteur NMDA par 50 μ M d'AP5 (Acide 2-amino-5-phosphonovalérique) inhibe l'induction de la DLT chez les rats jeunes adultes naïfs et chez les souris sauvages non alcoolisés montrant ainsi que la DLT dépend bien du récepteur NMDA (résultat non illustré). En résumé, l'ensemble des modèles utilisés perturbent la DLT vraisemblablement via un mécanisme métaplastique impliquant une modification de la balance des sous-unités GluN2A et GluN2B, soit par une exposition à l'éthanol, soit par l'absence de HSF2.

D'autre part, 48 heures après deux épisodes de *binge drinking*, la PLT induite par un protocole électrique à 20Hz est augmentée chez les rats alcoolisés comparés aux animaux contrôles. Ceci s'accorde avec le décalage vers la gauche de la courbe BCM qui tend à faciliter l'induction de la PLT et tend donc à appuyer notre hypothèse d'une modification de la balance des sous-unités GluN2A et GluN2B. En revanche, l'alcoolisation chronique chez les souris sauvages diminue l'amplitude de la PLT par rapport aux souris sauvages naïves. Ce résultat ne s'accorde pas avec la théorie BCM. L'EtOH agit sur plusieurs cibles au niveau du réseau hippocampique, autres que le récepteur NMDA, dont les récepteurs GABA_A. Dans ce contexte, l'exposition prolongée à l'EtOH pourrait augmenter l'expression et l'adressage des sous-unités formant le récepteur GABA_A de type $\alpha 4\beta\gamma 2$ au niveau de la synapse, ce qui induirait une augmentation de l'inhibition synaptique dans le réseau (Olsen and Spigelman, 2012). Par conséquent, malgré la diminution du ratio GluN2A/GluN2B, l'augmentation du niveau d'inhibition dans le réseau hippocampique pourrait freiner l'induction de la PLT. Pour vérifier ce propos, il serait nécessaire d'effectuer des enregistrements de la PLT, chez les souris *hsf*^{-/-}, en présence d'un inhibiteur des récepteurs GABA_A tel que la bicuculine.

Un autre résultat important est que l'exposition chronique à l'EtOH des souris *hsf*^{-/-} n'a aucune incidence sur la plasticité synaptique. En effet, la DLT demeure abolie, comme chez les souris *hsf*^{-/-} naïves, et la PLT ne change pas. Ce résultat suggère que les souris *hsf*^{-/-} sont insensibles aux effets de l'EtOH sur la plasticité synaptique dans l'aire CA1. En revanche, en analysant la sensibilité pharmacologique du signal NMDA aux antagonistes GluN2A et GluN2B,

nous avons remarqué que la sensibilité s'inverse par rapport à celle des animaux sauvages alcoolisés, en diminuant la sensibilité du signal NMDA à un antagoniste GluN2B et en augmentant la sensibilité à un antagoniste GluN2A. De plus, ce résultat ne s'accorde pas avec la théorie BCM. En effet, en se basant sur cette théorie nous nous attendions à pouvoir induire une DLT chez ces souris après alcoolisation, alors que ce n'est pas le cas. Ceci suggère que d'autres facteurs sont impliqués dans la perturbation de la plasticité synaptique chez les souris *hsf2*^{-/-} après alcoolisation chronique dont, probablement, le récepteur GABA_A. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que l'enregistrement de la DLT en présence d'un inhibiteur du récepteur GABA_A, chez les souris *hsf2*^{-/-} après alcoolisation permet de restaurer la DLT. En revanche, le lien exact entre HSF2 et le récepteur GABA_A n'a jamais été établi. Toutefois, il a été montré que l'exposition à 60mM d'EtOH de neurones corticaux en culture augmente l'expression de HSF1, qui augmente à son tour la libération du GABA en modulant le complexe SNARE et particulièrement la protéine VAMP2 (Varodayan et al., 2011). Par conséquent, la perturbation de la DLT chez les souris *hsf2*^{-/-} avant et après alcoolisation peut être due, en partie, à une perturbation de la balance GluN2A/GluN2B mais aussi à une modification de la balance entre excitabilité/inhibition dans le réseau hippocampique, en faveur d'une plus forte inhibition. D'autres expériences sont donc nécessaires afin de clarifier l'origine exacte de la perturbation de la DLT chez les souris *hsf2*^{-/-} naïves et donc de mieux comprendre l'absence apparente de réponse à l'alcoolisation chronique de ces souris.

VIII. La DLT comme mécanisme important pour les apprentissages et la mémoire

Au travers de nos études, nous avons rapporté que le *binge drinking-like* induisait un déficit d'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet associée à une réduction de la DLT. D'autre part, des résultats en cours d'obtention nous permettront d'établir une corrélation entre l'amplitude de la DLT et le niveau de performance de l'animal dans ce test d'apprentissage de telle sorte que plus la DLT est faible et plus l'apprentissage est faible (figure 43) Dans un premier temps, ceci confirme les résultats obtenus au sein de notre équipe qui avait montré précédemment une abolition de la DLT (et une augmentation de la PLT), 48 heures après deux épisodes de *binge drinking*, et que ceci était accompagnée de déficits d'apprentissage chez le rat jeune adulte (Silvestre de Ferron et al., 2015). Ainsi, la

répétabilité de ce résultat suggère de manière forte que la DLT jouerait un rôle important dans la formation de certaines mémoires et de certains apprentissages et notamment, en ce qui nous concerne, dans le NOR. Cette constatation est d'autant plus intéressante que de nombreuses études se sont plutôt focalisées sur le rôle physiologique de la PLT dans les apprentissages au sein du système nerveux central sans vraiment s'intéresser à la DLT. D'ailleurs, cette dernière a été longtemps considérée comme jouant un rôle seulement dans la réversion de la PLT (Stanton, 1996) en étant probablement responsable de la suppression de la mémoire et donc de l'oubli (Tsumoto, 1993). Ce postulat a été révisé lorsqu'il est devenu clair que la PLT et la DLT pouvaient toutes les deux nécessiter l'activation du seul récepteur NMDA (Liu et al., 2004). En conséquence, nous pourrions tout aussi bien considérer que la DLT est responsable des apprentissages (ou du moins de certains apprentissages) et que la PLT jouerait seulement un rôle dans la réversion de la DLT et donc d'oubli des apprentissages plus concernés par le déclenchement d'une DLT (Kemp and Manahan-Vaughan, 2007, p. 2007). Cette idée n'est bien évidemment pas réaliste au regard du nombre d'études qui ont permis de mettre en évidence le rôle important de la PLT dans la formation de la mémoire et que le blocage de l'induction de la PLT abolie effectivement les apprentissages. Toutefois, d'autres mécanismes ont été par la suite supposés responsables de l'oubli comme la dé-potentialisation et la dé-dépression (Huang and Hsu, 2001; Meng et al., 2003). Les travaux du Dr Manahan-Vaughan, à Bochum, en Allemagne ont permis de mettre en évidence le rôle de la DLT dans l'apprentissage d'un nouvel environnement contenant des objets. En effet, ces auteurs rapportent que l'exploration et l'apprentissage de nouveaux objets facilite l'induction spontanée de la DLT dans l'hippocampe des rats *in vivo* (Manahan-Vaughan and Braunewell, 1999). A l'opposé, la PLT s'avère être plutôt augmentée lorsque le nouvel environnement est vide (Kemp and Manahan-Vaughan, 2004, p. 2004). Ainsi, dans un test de reconnaissance de nouvel objet, le mécanisme cellulaire à la base de l'exploration et de la mémorisation des objets ferait plutôt intervenir la DLT et sa réduction suite à l'exposition à l'EtOH, perturberait effectivement l'apprentissage des objets.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les effets d'une alcoolisation aigue ou chronique sur les mécanismes cellulaires liés à la mémoire et aux apprentissages en se focalisant sur les modifications qui touchent spécifiquement les sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA et les répercussions qui en découlent sur la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une modification de la balance de GluN2A/GluN2B en faveur d'une augmentation de GluN2B après deux formes d'alcoolisation, aigue et chronique chez deux espèces rongeurs, rat et souris et à différents âges, jeunes adultes et adultes. Cette perturbation de la balance induit, par conséquent, une diminution significative de DLT accompagnée d'un déficit d'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet. En outre, ces travaux montrent que les processus épigénétiques de type acétylation des histones par les enzymes HDAC sont impliqués dans la réponse à l'éthanol et l'ensemble de perturbations engendrées par une alcoolisation aigue de type binge drinking chez le rat jeune adulte. De plus, notre étude a mis en évidence, pour la première fois, l'implication d'un facteur de transcription, HSF2, dans la réponse à une consommation chronique à l'éthanol dans l'aire CA1 de l'hippocampe.

Résultats annexes

Implication de la réponse inflammatoire dans la perturbation de la DLT chez un modèle de rat de *binge drinking*

A l'heure actuelle, la réponse inflammatoire constitue une hypothèse intéressante pour expliquer certaines pathologies du cerveau dont les addictions. Dans le contexte d'EtOH, l'exposition à cette substance d'abus induit une inflammation au niveau cérébral pouvant altérer son bon fonctionnement. Dans ce contexte, une étude récente au sein de notre laboratoire a montré qu'un traitement à une substance anti-inflammatoire la N-acétylsystéine (NAC) (Uraz et al., 2013) réduit la motivation à consommer l'EtOH (Lebourgeois et al., 2018). De plus, l'effet de la NAC est renforcé en présence de la minocycline (Mino), une autre substance anti-inflammatoire qui semble améliorer la PLT (Hoshino et al., 2017) et le couplage de ces deux molécules prévient les déficits mnésiques chez le rat (Haber et al., 2013).

Nous nous sommes donc posés la question suivante : Est-ce que seulement deux injections d'éthanol à raison de 3g/kg séparées de 9 d'intervalle seraient suffisantes pour induire une inflammation au niveau de l'hippocampe et participeraient à la perturbation de la DLT observée 48 heures après administration d'EtOH ?

Pour répondre à cette question, j'ai travaillé avec Dr Catherine Vilpoux, Dr Stéphane Peineau ainsi que Chloé Deschamps (étudiante en master2). Ensemble, nous avons utilisé des rats mâles Sprague Dawley jeunes adultes âgés de 42 à 55 jours. Nous avons formé 4 groupes de rats : Un groupe qui reçoit deux injections d'éthanol à 3g/kg séparées de 9h d'intervalle (Silvestre de Ferron et al., 2015), un groupe contrôle recevant deux injections de solution saline, un groupe contrôle recevant deux injections de solution contenant de la minocycline à 45mg/kg et de la N-acétyl-systéine à 150mg/kg et un dernier groupe recevant deux injections d'EtOH séparées de 9 heures d'intervalle avec une injection de solution de minocycline et de N-acétyl systéine 30 minutes avant chaque injection.

Dr Vilpoux a effectué des marquages immunohistochimiques sur tranches d'hippocampe de rat afin d'examiner la présence du récepteur TLR4 au niveau neuronal, marqueur de neuroinflammation, 48 h après l'exposition à deux épisodes de *binge drinking*. De plus, nous avons évalué les capacités d'apprentissage de l'animal dans un test de reconnaissance de nouvel objet pour chaque condition. Afin d'étudier la DLT, nous avons

effectué des enregistrements électrophysiologiques sur tranches aigues de CA1 en utilisant un la technique de potentiel de champs. Certains animaux utilisés pour les expériences de comportement ont été sacrifiés à la fin du test pour préparer les tranches d'hippocampe et enregistrer la DLT.

Les marquages immunohistochimiques montrent que deux épisodes de *binge drinking* à 3g/kg chez le rat jeune adulte sont suffisants pour augmenter le niveau de TLR4 au niveau des neurones pyramidaux de l'aire CA1 (figure 41). Ce résultat suggère la présence d'une inflammation accompagnée d'une diminution significative de l'amplitude de la DLT ainsi qu'un déficit d'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet.

De manière intéressante, l'injection des molécules anti-inflammatoires (NAC et Mino) 30 min avant chaque injection d'EtOH prévient les effets du *binge drinking* sur la DLT et les troubles d'apprentissage (figure 42).

L'utilisation d'un même animal à la fois dans le test comportemental et pour les enregistrements électrophysiologiques de la DLT nous a permis établir une corrélation entre la performance dans le test d'apprentissage et le niveau de la DLT. Cette corrélation montre que plus le niveau de la DLT est faible plus les performances sont mauvaises.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence l'induction d'une inflammation suite à deux épisodes de *binge drinking* et que cette réponse inflammatoire participe aux effets de l'EtOH sur la DLT.

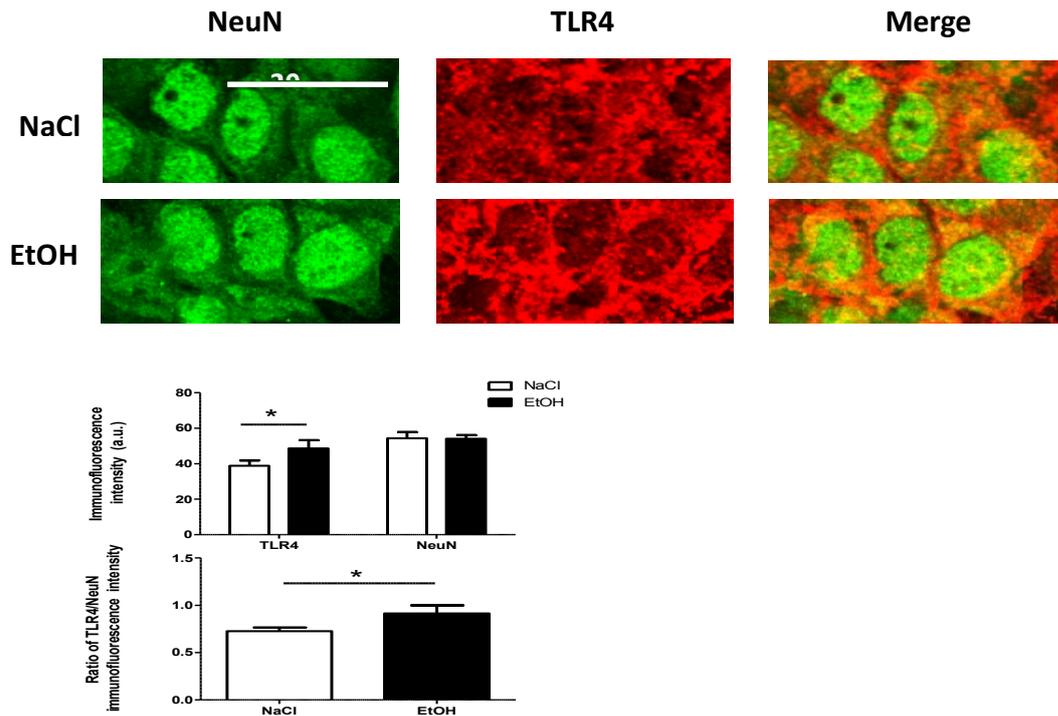


Figure 41: Co-immunomarkage de TLR4 et NeuN sur des tranches de CA1 de rats jeunes adultes. Le marquage de NeuN, un biomarqueur neuronal, apparaît en vert. Le marquage de TLR4 apparaît en rouge. La superposition des deux marquages apparaît en orange montrant une co-localisation de TLR4 et de NeuN. L'histogramme du haut correspond à l'intensité de l'immunofluorescence pour TLR4 et NeuN. L'immunofluorescence de TLR4 augmente dans l'aire CA1 après protocole d'alcoolisation tandis que l'intensité d'immunofluorescence de NeuN ne change pas. L'histogramme du bas montre le ratio de l'intensité d'immunofluorescence de TLR4 chez les contrôles et le groupe EtOH normalisé par rapport à l'intensité d'immunofluorescence de NeuN. *, $p < 0.05$.

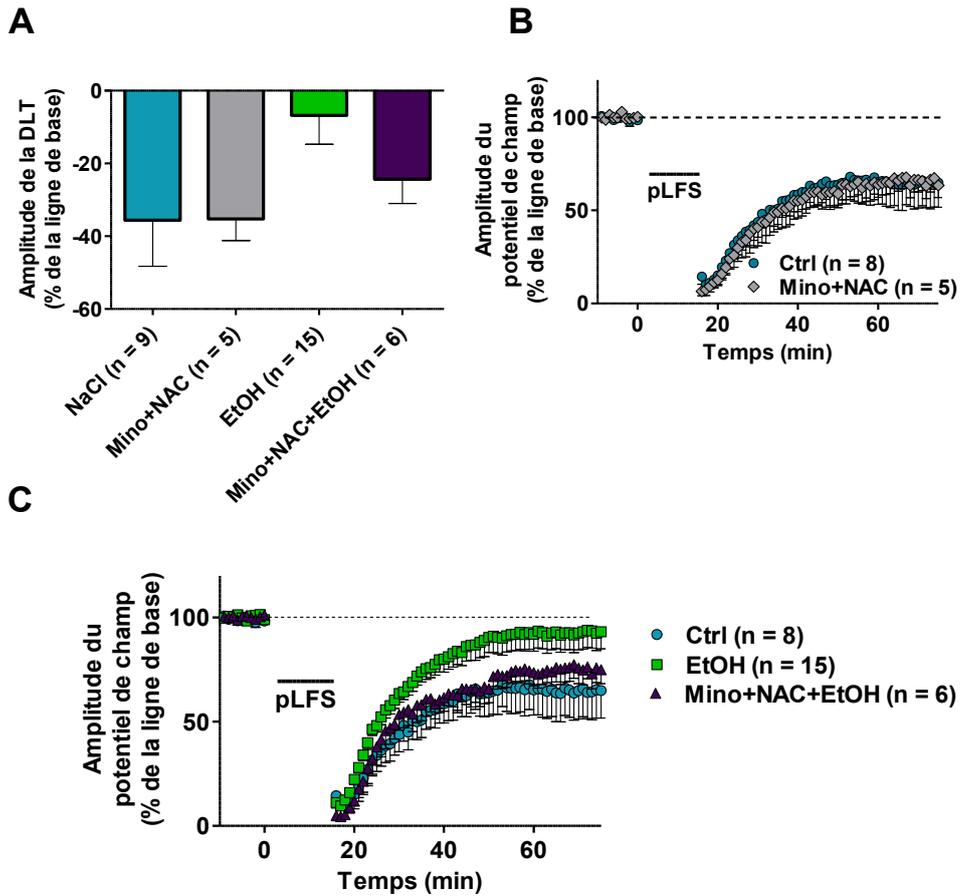


Figure 42: Effets de l'éthanol (3g/kg i.p.) et de la combinaison minocycline + N-acetylcystéine couplée ou non à l'EtOH sur la DLT 48h après l'administration des différents traitements. (A) Histogramme représentant l'amplitude de la DLT pendant les 10 dernières minutes d'enregistrement dans les différents groupes. (B) Enregistrements moyennés de l'amplitude du potentiel de champ après induction de la DLT par pLFS 200-900 dans les groupes contrôle (NaCl) et minocycline+NAC (Mino+NAC). (C) Enregistrements moyennés de l'amplitude du potentiel de champ après induction de la DLT par pLFS 200-900 dans les groupes contrôle (NaCl), éthanol seul (EtOH) ou couplé à la minocycline+NAC (Mino+NAC+EtOH).

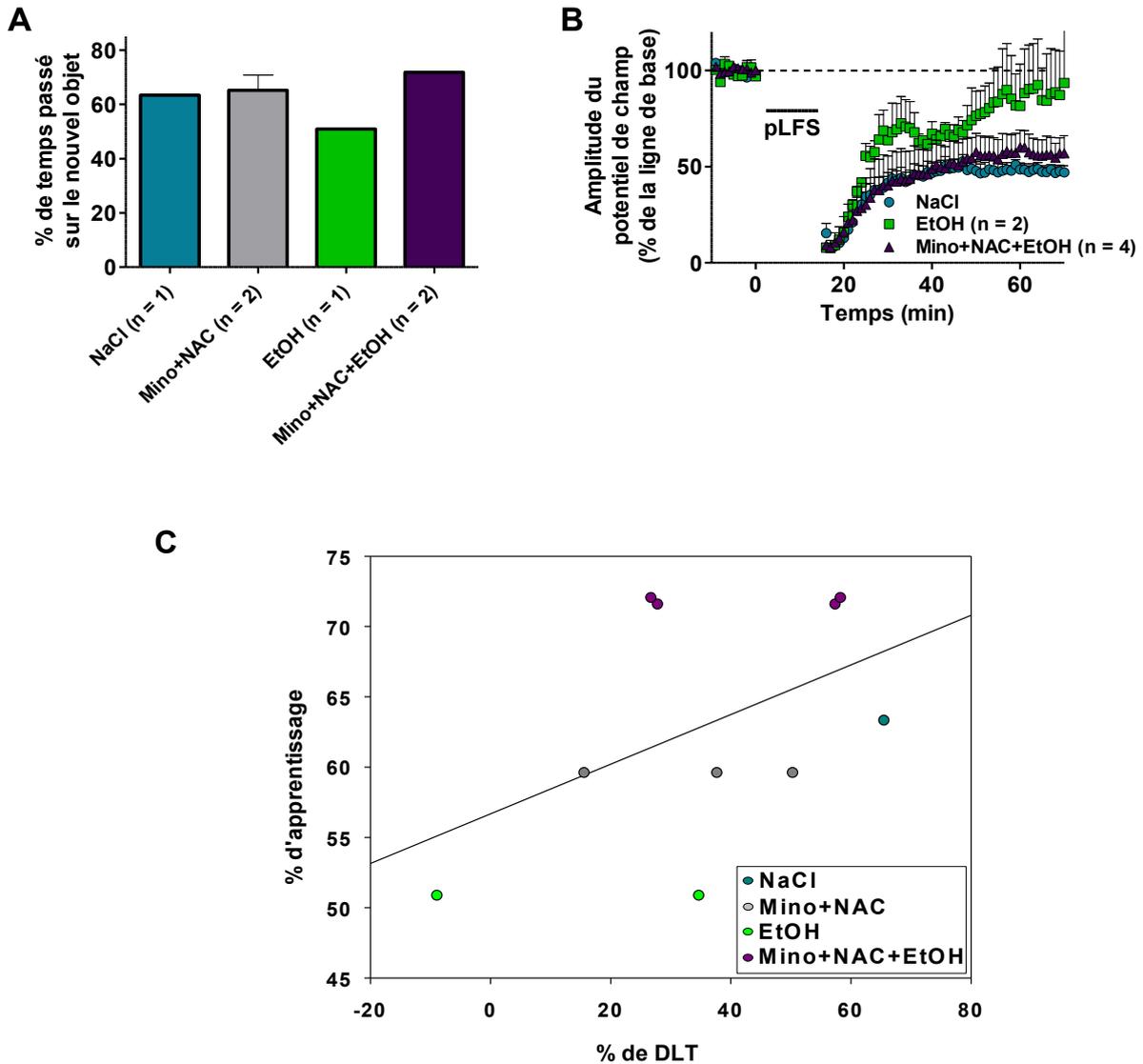


Figure 43: Enregistrements de la DLT après différents traitements et corrélation avec les résultats des mêmes animaux lors du test d'apprentissage. (A) Histogramme représentant le pourcentage de temps passé sur le nouvel objet (phase de reconnaissance) pour les groupes contrôle (NaCl), éthanol (EtOH) et Minocycline+N-acétylcystéine seules (Mino+NAC) ou couplées à l'éthanol (Mino+NAC+EtOH). (B) Enregistrements moyennés de l'amplitude du potentiel de champ après induction de la DLT par stimulation basse fréquence pLFS200-900 suivant le test de reconnaissance de nouvel objet dans les groupes contrôle (NaCl), éthanol (EtOH) et Minocycline+N-acétylcystéine couplées à l'éthanol (Mino+NAC+EtOH). (C) Corrélation entre le pourcentage d'apprentissage lors du test de reconnaissance de nouvel objet et l'amplitude de la DLT après différents traitements. $R^2 = 0,22$

Références

- Abane, R., Mezger, V., 2010. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J.* 277, 4150–4172. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07830.x>
- Abraham, W.C., Bear, M.F., 1996. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19, 126–130. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)80018-X)
- Abrahao, K.P., Salinas, A.G., Lovinger, D.M., 2017. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 96, 1223–1238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>
- Acheson, S.K., Stein, R.M., Swartzwelder, H.S., 1998. Impairment of semantic and figural memory by acute ethanol: age-dependent effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 1437–1442.
- Agudelo, M., Gandhi, N., Saiyed, Z., Pichili, V., Thangavel, S., Khatavkar, P., Yndart-Arias, A., Nair, M., 2011. Effects of alcohol on histone deacetylase 2 (HDAC2) and the neuroprotective role of trichostatin A (TSA). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 1550–1556. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01492.x>
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- Alozai, U. ullah, Sharma, S., 2018. Drug and Alcohol Use, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Alvestad, R.M., Grosshans, D.R., Coultrap, S.J., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Browning, M.D., 2003. Tyrosine Dephosphorylation and Ethanol Inhibition of N-Methyl-d-aspartate Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 278, 11020–11025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210167200>
- Amaral, D.G., 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 225–229.
- Amin, J., Weiss, D.S., 1993. GABAA receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366, 565–569. <https://doi.org/10.1038/366565a0>
- Anckar, J., Sistonen, L., 2011. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1089–1115. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>
- Anders, D.L., Blevins, T., Smothers, C.T., Woodward, J.J., 2000. Reduced Ethanol Inhibition of N-Methyl-d-aspartate Receptors by Deletion of the NR1 C0 Domain or Overexpression of α -Actinin-2 Proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 15019–15024. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15019>
- Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* 13, 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Anwyl, R., 2006. Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression. *Prog. Neurobiol.* 78, 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.12.001>
- Anwyl, R., 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Rev.* 29, 83–120. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(98\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00050-2)
- Bahari-Javan, S., Maddalena, A., Kerimoglu, C., Wittnam, J., Held, T., Bähr, M., Burkhardt, S., Delalle, I., Kügler, S., Fischer, A., Sananbenesi, F., 2012. HDAC1 regulates fear extinction in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5062–5073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0079-12.2012>

- Banerjee, A., Larsen, R.S., Philpot, B.D., Paulsen, O., 2016. Roles of presynaptic NMDA receptors in neurotransmission and plasticity. *Trends Neurosci.* 39, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.11.001>
- Banke, T.G., Bowie, D., Lee, H.-K., Huganir, R.L., Schousboe, A., Traynelis, S.F., 2000. Control of GluR1 AMPA Receptor Function by cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Neurosci.* 20, 89–102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-01-00089.2000>
- Barnard, E.A., Bilbe, G., Houamed, K., Moss, S.J., Van Renterghem, C., Smart, T.G., 1987. Functional expression in the *Xenopus* oocyte of messenger ribonucleic acids encoding brain neurotransmitter receptors: further characterisation of the implanted GABA receptor. *Neuropharmacology* 26, 837–844.
- Barria, A., Derkach, V., Soderling, T., 1997a. Identification of the Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Regulatory Phosphorylation Site in the α -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type Glutamate Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32727–32730. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32727>
- Barria, A., Malinow, R., 2005. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48, 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.034>
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., Soderling, T.R., 1997b. Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation. *Science* 276, 2042–2045. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2042>
- Baudry, M., Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Briz, V., Bi, X., 2015. Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain Res.* 1621, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.033>
- Beato, M., Eisfeld, K., 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25, 3559–3563.
- Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., Zastrow, M. von, Malenka, R.C., 2000. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat. Neurosci.* 3, 1291–1300. <https://doi.org/10.1038/81823>
- Beck, F., Richard, J.-B., 2014. [Alcohol use in France]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 43, 1067–1079. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.02.027>
- Bellone, C., Lüscher, C., n.d. mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1280–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03979.x>
- Belmadani, A., Kumar, S., Schipma, M., Collins, M.A., Neafsey, E.J., 2004. Inhibition of amyloid-beta-induced neurotoxicity and apoptosis by moderate ethanol preconditioning. *Neuroreport* 15, 2093–2096.
- Bengoechea, O., Gonzalo, L.M., 1991. Effects of alcoholization on the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 123, 112–114.
- Benke, T.A., Lüthi, A., Isaac, J.T.R., Collingridge, G.L., 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393, 793–797. <https://doi.org/10.1038/31709>
- 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.

Bienenstock, E.L., Cooper, L.N., Munro, P.W., 1982. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J. Neurosci.* 2, 32–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-01-00032.1982>

Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. <https://doi.org/10.1038/nature05913>

Björk, J.K., Sistonen, L., 2010. Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family. *FEBS J.* 277, 4126–4139.

Blackstad, T.W., 1956. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 105, 417–537.

Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>

Bliss, T.V., Gardner-Medwin, A.R., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 357–374.

Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.

Blitzer, R.D., Connor, J.H., Brown, G.P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., Landau, E.M., 1998. Gating of CaMKII by cAMP-Regulated Protein Phosphatase Activity During LTP. *Science* 280, 1940–1943. <https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1940>

Blitzer, R.D., Gil, O., Landau, E.M., 1990. Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain Res.* 537, 203–208. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90359-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90359-J)

Bohnsack, J.P., Hughes, B.A., O’Buckley, T.K., Edokpolor, K., Besheer, J., Morrow, A.L., 2018. Histone deacetylases mediate GABAA receptor expression, physiology, and behavioral maladaptations in rat models of alcohol dependence. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 43, 1518–1529. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0034-8>

Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W., 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>

Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P., 2008. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron* 60, 961–974. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.012>

Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.-P., Vourc’h, C., Matthias, P., Khochbin, S., 2007. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 21, 2172–2181. <https://doi.org/10.1101/gad.436407>

Braillon, A., 2018. Alcohol consumption and cognitive decline: the elephant in the room? *Lancet Public Health* 3, e216. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30070-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30070-7)

Bredt, D.S., Nicoll, R.A., 2003. AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron* 40, 361–379. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00640-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00640-8)

Brown, I.R., Rush, S.J., 1999. Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia. *Brain Res.* 821, 333–340.

Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S.F., Mülle, C., 1999. Kainate Receptor-Mediated Responses in the CA1 Field of Wild-Type and GluR6-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 19, 653–663. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00653.1999>

- Buzsáki, G., 1984. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 22, 131–153.
- Caillard, O., Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., 1999. Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 518, 109–119.
- Caillard, Olivier, Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., 1999. Mechanisms of Induction and Expression of Long-Term Depression at GABAergic Synapses in the Neonatal Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 19, 7568–7577. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-17-07568.1999>
- Carpenter-Hyland, E.P., Woodward, J.J., Chandler, L.J., 2004. Chronic Ethanol Induces Synaptic But Not Extrasynaptic Targeting of NMDA Receptors. *J. Neurosci.* 24, 7859–7868. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1902-04.2004>
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., Xia, H., Lüscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Zastrow, M. von, 1999. Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14112–14117. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14112>
- Carson, E.J., Pruetz, S.B., 1996. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 132–138.
- Carta, M., Ariwodola, O.J., Weiner, J.L., Valenzuela, C.F., 2003. Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6813–6818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1137276100>
- Carta, M., Fièvre, S., Gorlewicz, A., Mulle, C., 2014. Kainate receptors in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1835–1844. <https://doi.org/10.1111/ejn.12590>
- Chandler, L.J., Harris, R.A., Crews, F.T., 1998. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 491–495. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01268-1](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01268-1)
- Chang, Y., Östling, P., Åkerfelt, M., Trouillet, D., Rallu, M., Gitton, Y., El Fatimy, R., Fardeau, V., Le Crom, S., Morange, M., Sistonon, L., Mezger, V., 2006. Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. *Genes Dev.* 20, 836–847. <https://doi.org/10.1101/gad.366906>
- Chater, T.E., Goda, Y., 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 401. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00401>
- Chen, H.P., Zhao, Y.T., Zhao, T.C., 2015. Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression (Histone deacetylases in cancer). *Crit. Rev. Oncog.* 20, 35–47.
- Chen, Y., Wang, B., Liu, D., Li, J.J., Xue, Y., Sakata, K., Zhu, L., Heldt, S.A., Xu, H., Liao, F.-F., 2014. Hsp90 Chaperone Inhibitor 17-AAG Attenuates A β -Induced Synaptic Toxicity and Memory Impairment. *J. Neurosci.* 34, 2464–2470. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0151-13.2014>
- Chevalyere, V., Castillo, P.E., 2004. Endocannabinoid-Mediated Metaplasticity in the Hippocampus. *Neuron* 43, 871–881. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.036>
- Chu, B., Soncin, F., Price, B.D., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 1996. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J. Biol. Chem.* 271, 30847–30857.
- Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>

- Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., 2006. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol. Cell* 23, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.017>
- Coley, A.A., Gao, W.-J., 2018. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 82, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.016>
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., Spedding, M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.063>
- Collingridge, G.L., Peineau, S., Howland, J.G., Wang, Y.T., 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 459–473. <https://doi.org/10.1038/nrn2867>
- Collins, M.A., Neafsey, E.J., Wang, K., Achille, N.J., Mitchell, R.M., Sivaswamy, S., 2010. Moderate ethanol preconditioning of rat brain cultures engenders neuroprotection against dementia-inducing neuroinflammatory proteins: possible signaling mechanisms. *Mol. Neurobiol.* 41, 420–425. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8138-0>
- Courtney, K.E., Polich, J., 2010. Binge Drinking Effects on EEG in Young Adult Humans. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2325–2336. <https://doi.org/10.3390/ijerph7052325>
- Crego, A., Cadaveira, F., Parada, M., Corral, M., Caamaño-Isorna, F., Rodríguez Holguín, S., 2012. Increased amplitude of P3 event-related potential in young binge drinkers. *Alcohol* 46, 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.10.002>
- Crick, F., 1984. Memory and molecular turnover. *Nature* 312, 101.
- Criswell, H.E., Breese, G.R., 2005. A Conceptualization of Integrated Actions of Ethanol Contributing to its GABA-mimetic Profile: A Commentary. *Neuropsychopharmacology* 30, 1407–1425. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300750>
- Criswell, H.E., Simson, P.E., Duncan, G.E., McCown, T.J., Herbert, J.S., Morrow, A.L., Breese, G.R., 1993. Molecular basis for regionally specific action of ethanol on gamma-aminobutyric acidA receptors: generalization to other ligand-gated ion channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 522–537.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Sci STKE* 2004, re16–re16. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Cummings, J.A., Mulkey, R.M., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1996. Ca²⁺ Signaling Requirements for Long-Term Depression in the Hippocampus. *Neuron* 16, 825–833. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80102-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80102-6)
- Curtis, D.R., Phillis, J.W., Watkins, J.C., 1961. Actions of aminoacids on the isolated hemisected spinal cord of the toad. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 16, 262–283.
- Curtis, D.R., Watkins, J.C., 1961. Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature* 191, 1010–1011.
- Dan, Y., Poo, M.-M., 2006. Spike Timing-Dependent Plasticity: From Synapse to Perception. *Physiol. Rev.* 86, 1033–1048. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2005>
- Day, J.J., Sweatt, J.D., 2011. Cognitive neuroepigenetics: A role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.12.008>
- Debanne, D., Gähwiler, B.H., Thompson, S.M., 1994. Asynchronous pre- and postsynaptic activity induces associative long-term depression in area CA1 of the rat hippocampus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1148–1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1148>

- Deitrich, R.A., Dunwiddie, T.V., Harris, R.A., Erwin, V.G., 1989. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacol. Rev.* 41, 489–537.
- Dudek, S.M., Bear, M.F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 4363–4367. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4363>
- Dumas, T.C., 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: Modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog. Neurobiol.* 76, 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.08.002>
- El Fatimy, R., Miozzo, F., Le Mouël, A., Abane, R., Schwendimann, L., Sabéran-Djoneidi, D., de Thonel, A., Massaoudi, I., Paslaru, L., Hashimoto-Torii, K., Christians, E., Rakic, P., Gressens, P., Mezger, V., 2014. Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol. Med.* 6, 1043–1061. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303311>
- English, J.D., Sweatt, J.D., 1997. A Requirement for the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 19103–19106. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19103>
- Ferraguti, F., Shigemoto, R., 2006. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 483–504. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0266-5>
- Fetterolf, F., Foster, K.A., 2011. Regulation of Long-Term Plasticity Induction by the Channel and C-Terminal Domains of GluN2 Subunits. *Mol. Neurobiol.* 44, 71–82. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8190-4>
- Fincham, J.R.S., 1997. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Edited by V. E. A. Russo, R. A. Martienssen and A. D. Riggs. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 693+xii pages. Price \$125. ISBN 0 87969 490 4. *Genet. Res.* 69, 159–162.
- Finegersh, A., Homanics, G.E., 2014. Acute ethanol alters multiple histone modifications at model gene promoters in the cerebral cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 1865–1873. <https://doi.org/10.1111/acer.12465>
- Fiorenza, M.T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., Zimarino, V., 1995. Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 23, 467–474.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.-H., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182. <https://doi.org/10.1038/nature05772>
- Foster, K.A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., Sheng, M., 2010. Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 2676–2685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4022-09.2010>
- Fox, K., Daw, N., Sato, H., Czepita, D., 1992. The effect of visual experience on development of NMDA receptor synaptic transmission in kitten visual cortex. *J. Neurosci.* 12, 2672–2684. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-07-02672.1992>
- Frangaj, A., Fan, Q.R., 2017. Structural biology of GABAB receptor. *Neuropharmacology.* <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.011>
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I)

- Frye, G.D., Vogel, R.A., Mailman, R.B., Ondrusek, M.G., Wilson, J.H., Mueller, P.A., Breese, G.R., 1980. A comparison of behavioral and neurochemical effects of ethanol and chlordiazepoxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 132, 729–737.
- Fujita, Y., Morinobu, S., Takei, S., Fuchikami, M., Matsumoto, T., Yamamoto, S., Yamawaki, S., 2012. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. *J. Psychiatr. Res.* 46, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.01.026>
- Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E., Muller, D., 1993. Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 268, 7863–7867.
- Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Gräff, J., Guan, J.-S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., Tsai, L.-H., 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466, 1105–1109. <https://doi.org/10.1038/nature09271>
- GBD 2016 Alcohol Collaborators, 2018. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond. Engl.* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31310-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31310-2)
- Ge, Y., Dong, Z., Bagot, R.C., Howland, J.G., Phillips, A.G., Wong, T.P., Wang, Y.T., 2010. Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16697–16702. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008200107>
- Gilmore, A.K., Bountress, K.E., Selmanoff, M., George, W.H., 2018. Reducing Heavy Episodic Drinking, Incapacitation, and Alcohol-Induced Blackouts: Secondary Outcomes of a Web-Based Combined Alcohol Use and Sexual Assault Risk Reduction Intervention. *Violence Women* 24, 1299–1313. <https://doi.org/10.1177/1077801218787934>
- Gladding, C.M., Raymond, L.A., 2011. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol. Cell. Neurosci., Membrane Trafficking and Cytoskeletal Dynamics in Neuronal Function* 48, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.001>
- Gombos, I., Crul, T., Piotto, S., Güngör, B., Török, Z., Balogh, G., Péter, M., Slotte, J.P., Campana, F., Pilbat, A.-M., Hunya, Á., Tóth, N., Literati-Nagy, Z., Vigh, L., Glatz, A., Brameshuber, M., Schütz, G.J., Hevener, A., Febbraio, M.A., Horváth, I., Vigh, L., 2011. Membrane-Lipid Therapy in Operation: The HSP Co-Inducer BGP-15 Activates Stress Signal Transduction Pathways by Remodeling Plasma Membrane Rafts. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028818>
- Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., Thiele, D.J., 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 4–19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73>
- Gräff, J., Tsai, L.-H., 2013. The Potential of HDAC Inhibitors as Cognitive Enhancers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 311–330. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140216>
- Gravielle, M.C., 2018. Regulation of GABAA receptors by prolonged exposure to endogenous and exogenous ligands. *Neurochem. Int.* 118, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.05.015>
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., Choquet, D., 2006. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18769–18774. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605238103>

- Grooms, S.Y., Noh, K.-M., Regis, R., Bassell, G.J., Bryan, M.K., Carroll, R.C., Zukin, R.S., 2006. Activity Bidirectionally Regulates AMPA Receptor mRNA Abundance in Dendrites of Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 26, 8339–8351. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0472-06.2006>
- Grossman, A.W., Churchill, J.D., Bates, K.E., Kleim, J.A., Greenough, W.T., 2002. A brain adaptation view of plasticity: is synaptic plasticity an overly limited concept?, in: *Progress in Brain Research, Plasticity in the Adult Brain: From Genes to Neurotherapy*. Elsevier, pp. 91–108. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)38073-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)38073-7)
- Grover, C.A., Frye, G.D., Griffith, W.H., 1994. Acute tolerance to ethanol inhibition of NMDA-mediated EPSPs in the CA1 region of the rat hippocampus. *Brain Res.* 642, 70–76. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90906-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90906-7)
- Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.-H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature07925>
- Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W.S., Voellmy, R., 2005. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-4>
- Haber, M., Abdel Baki, S.G., Grin'kina, N.M., Irizarry, R., Ershova, A., Orsi, S., Grill, R.J., Dash, P., Bergold, P.J., 2013. Minocycline plus N-acetylcysteine synergize to modulate inflammation and prevent cognitive and memory deficits in a rat model of mild traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 249, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.002>
- Haldimann, P., Muriset, M., Vigh, L., Goloubinoff, P., 2011. The Novel Hydroxylamine Derivative NG-094 Suppresses Polyglutamine Protein Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 286, 18784–18794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234773>
- Hammond, C., 2014. *Cellular and Molecular Neurophysiology*. Academic Press.
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Hashimoto-Torii, K., Kawasawa, Y.I., Kuhn, A., Rakic, P., 2011. Combined transcriptome analysis of fetal human and mouse cerebral cortex exposed to alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4212–4217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100903108>
- Hawk, J.D., Florian, C., Abel, T., 2011. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn. Mem.* 18, 367–370. <https://doi.org/10.1101/lm.2097411>
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., Malinow, R., 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262–2267.
- He, H., Soncin, F., Grammatikakis, N., Li, Y., Sigano, A., Gong, J., Brown, S.A., Kingston, R.E., Calderwood, S.K., 2003. Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J. Biol. Chem.* 278, 35465–35475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304663200>

- Hendricson, A.W., Miao, C.L.A., Lippmann, M.J., Morrisett, R.A., 2002. Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 938–944.
- Hentze, N., Le Breton, L., Wiesner, J., Kempf, G., Mayer, M.P., 2016. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.11576>
- Hermens, D.F., Lagopoulos, J., 2018. Binge Drinking and the Young Brain: A Mini Review of the Neurobiological Underpinnings of Alcohol-Induced Blackout. *Front. Psychol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00012>
- Holmes, A., Spanagel, R., Krystal, J.H., 2013. Glutamatergic targets for new alcohol medications. *Psychopharmacology (Berl.)* 229. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3226-2>
- Hooper, Philip L., Durham, H.D., Török, Z., Hooper, Paul L., Crul, T., Vigh, L., 2016. The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. *Cell Stress Chaperones* 21, 745–753. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0709-1>
- Hoshino, K., Hayakawa, M., Morimoto, Y., 2017. Minocycline Prevents the Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation in the Septic Mouse. *Shock Augusta Ga* 48, 209–214. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000847>
- Hrabetova, S., Sacktor, T.C., 1996. Bidirectional Regulation of Protein Kinase Mζ in the Maintenance of Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 16, 5324–5333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-17-05324.1996>
- Huang, C.C., Hsu, K.S., 2001. Progress in understanding the factors regulating reversibility of long-term potentiation. *Rev. Neurosci.* 12, 51–68.
- Huber, K.M., Kayser, M.S., Bear, M.F., 2000. Role for Rapid Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal mGluR-Dependent Long-Term Depression. *Science* 288, 1254–1256. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1254>
- Hurd, P.J., 2010. The era of epigenetics. *Brief. Funct. Genomics* 9, 425–428. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elq039>
- Iacobucci, G.J., Popescu, G.K., 2017. NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 236–249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.24>
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S.T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J.C., Chan, G., Storm, D.R., 1998. Cross Talk between ERK and PKA Is Required for Ca²⁺ Stimulation of CREB-Dependent Transcription and ERK Nuclear Translocation. *Neuron* 21, 869–883. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80602-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80602-9)
- Izumi, Y., Murayama, K., Tokuda, K., Krishnan, K., Covey, D.F., Zorumski, C.F., 2007. GABAergic neurosteroids mediate the effects of ethanol on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1881–1888. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05809.x>
- Jarome, T.J., Lubin, F.D., 2014. Epigenetic Mechanisms of Memory Formation and Reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 0, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.002>
- Jennison, K.M., Johnson, K.A., 1994. Drinking-induced blackouts among young adults: results from a national longitudinal study. *Int. J. Addict.* 29, 23–51.

- Jin, C., Woodward, J.J., 2006. Effects of 8 Different NR1 Splice Variants on the Ethanol Inhibition of Recombinant NMDA Receptors. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 673–679. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00079.x>
- Jirtle, R.L., Skinner, M.K., 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 253–262. <https://doi.org/10.1038/nrg2045>
- Job, C., Eberwine, J., 2001. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 889–898. <https://doi.org/10.1038/35104069>
- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Garner, C.C., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., Malenka, R.C., 2004. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* 7, 244–253. <https://doi.org/10.1038/nn1189>
- Jury, N.J., Radke, A.K., Pati, D., Kocharian, A., Mishina, M., Kash, T.L., Holmes, A., 2018. NMDA receptor GluN2A subunit deletion protects against dependence-like ethanol drinking. *Behav. Brain Res.* 353, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.029>
- Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T.-P., Rallu, M., Gitton, Y., Pirkkala, L., Loones, M.-T., Paslaru, L., Larney, S., Hiard, S., Morange, M., Sistonen, L., Mezger, V., 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* 21, 2591–2601. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2591>
- Kalluri, H.S., Mehta, A.K., Ticku, M.K., 1998. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 58, 221–224.
- Kameyama, K., Lee, H.-K., Bear, M.F., Huganir, R.L., 1998. Involvement of a Postsynaptic Protein Kinase A Substrate in the Expression of Homosynaptic Long-Term Depression. *Neuron* 21, 1163–1175. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80633-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80633-9)
- Kang, H., Schuman, E.M., 1996. A Requirement for Local Protein Synthesis in Neurotrophin-Induced Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 273, 1402–1406. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1402>
- Karakas, E., Simorowski, N., Furukawa, H., 2011. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475, 249–253. <https://doi.org/10.1038/nature10180>
- Katz, B., Miledi, R., n.d. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol.* 195, 481–492. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008469>
- Kazantsev, A.G., Thompson, L.M., 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 854–868. <https://doi.org/10.1038/nrd2681>
- Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2007. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* 30, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.01.002>
- Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2004. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 8192–8197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402650101>
- Kemp, N., Bashir, Z.I., 2001. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 65, 339–365. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00013-2)

- Kemp, N., McQueen, J., Faulkes, S., Bashir, Z.I., 2000. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur. J. Neurosci.* 12, 360–366.
- Kervern, M., Silvestre de Ferron, B., Alaux-Cantin, S., Fedorenko, O., Antol, J., Naassila, M., Pierrefiche, O., 2015. Aberrant NMDA-dependent LTD after perinatal ethanol exposure in young adult rat hippocampus. *Hippocampus* 25, 912–923. <https://doi.org/10.1002/hipo.22414>
- Khan, O., La Thangue, N.B., 2012. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol. Cell Biol.* 90, 85–94. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.100>
- Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J.T., Delalle, I., Baur, J.A., Sui, G., Armour, S.M., Puigserver, P., Sinclair, D.A., Tsai, L.-H., 2007. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 26, 3169–3179. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601758>
- Kim, J.J., Foy, M.R., Thompson, R.F., 1996. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 4750–4753. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4750>
- Kim, J.-S., Shukla, S.D., 2006. Acute in vivo effect of ethanol (binge drinking) on histone H3 modifications in rat tissues. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 41, 126–132. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agh248>
- Kim, Y.Z., 2014. Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res. Treat.* 2, 7–21. <https://doi.org/10.14791/btrt.2014.2.1.7>
- Kirkwood, A., Dudek, S.M., Gold, J.T., Aizenman, C.D., Bear, M.F., 1993. Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260, 1518–1521. <https://doi.org/10.1126/science.8502997>
- Kirkwood, A., Rioult, M.C., Bear, M.F., 1996. Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature* 381, 526–528. <https://doi.org/10.1038/381526a0>
- Kondo, N., Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Doi, H., Matsumoto, S., Miyazaki, Y., Iida, M., Tohnai, G., Nakatsuji, H., Ishigaki, S., Fujioka, Y., Watanabe, H., Tanaka, F., Nakai, A., Sobue, G., 2013. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat. Commun.* 4, 1405. <https://doi.org/10.1038/ncomms2417>
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 24, 97–129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0)
- Kopelman, M.D., Thomson, A.D., Guerrini, I., Marshall, E.J., 2009. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 44, 148–154. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn118>
- Korpi, E.R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D.J., Hyytiä, P., Dawe, G.S., 2015. Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Krnjević, K., Schwartz, S., 1967. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp. Brain Res.* 3, 320–336.

- Kullmann, D.M., 1999. AMPA Receptor Attrition in Long-Term Depression. *Neuron* 24, 288–290. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80841-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80841-7)
- Kumar, A., Choi, K.-H., Renthal, W., Tsankova, N.M., Theobald, D.E.H., Truong, H.-T., Russo, S.J., Laplant, Q., Sasaki, T.S., Whistler, K.N., Neve, R.L., Self, D.W., Nestler, E.J., 2005. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.023>
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 413–426. <https://doi.org/10.1038/nrn2153>
- Lebourgeois, S., González-Marín, M.C., Jeanblanc, J., Naassila, M., Vilpoux, C., 2018. Effect of N-acetylcysteine on motivation, seeking and relapse to ethanol self-administration. *Addict. Biol.* 23, 643–652. <https://doi.org/10.1111/adb.12521>
- Lee, H.-K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., Huganir, R.L., 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959. <https://doi.org/10.1038/35016089>
- Lee, H.-K., Kameyama, K., Huganir, R.L., Bear, M.F., 1998. NMDA Induces Long-Term Synaptic Depression and Dephosphorylation of the GluR1 Subunit of AMPA Receptors in Hippocampus. *Neuron* 21, 1151–1162. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80632-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80632-7)
- Lee, S.H., Liu, L., Wang, Y.T., Sheng, M., 2002. Clathrin Adaptor AP2 and NSF Interact with Overlapping Sites of GluR2 and Play Distinct Roles in AMPA Receptor Trafficking and Hippocampal LTD. *Neuron* 36, 661–674. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01024-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01024-3)
- Legastelois, R., Jeanblanc, J., Vilpoux, C., Bourguet, E., Naassila, M., 2017. Mécanismes épigénétiques et troubles de l'usage d'alcool : une cible thérapeutique intéressante? *Biol. Aujourd'hui* 211, 83–91. <https://doi.org/10.1051/jbio/2017014>
- Lerma, J., 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 481–495. <https://doi.org/10.1038/nrn1118>
- Levenson, J.M., O'Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D., 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 279, 40545–40559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200>
- Li, J., Guo, Y., Schroeder, F.A., Youngs, R.M., Schmidt, T.W., Ferris, C., Konradi, C., Akbarian, S., 2004. Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. *J. Neurochem.* 90, 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02569.x>
- Liang, J., Zhang, N., Cagetti, E., Houser, C.R., Olsen, R.W., Spigelman, I., 2006. Chronic Intermittent Ethanol-Induced Switch of Ethanol Actions from Extrasynaptic to Synaptic Hippocampal GABAA Receptors. *J. Neurosci.* 26, 1749–1758. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4702-05.2006>
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151–1191. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>
- Lisdahl, K.M., Gilbert, E.R., Wright, N.E., Shollenbarger, S., 2013a. Dare to Delay? The Impacts of Adolescent Alcohol and Marijuana Use Onset on Cognition, Brain Structure, and Function. *Front. Psychiatry* 4. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00053>

- Lisdahl, K.M., Thayer, R., Squeglia, L.M., McQueeney, T.M., Tapert, S.F., 2013b. Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents. *Psychiatry Res.* 211, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.07.009>
- Lisman, J., 1989. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9574–9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9574>
- Lisman, J.E., Harris, K.M., 1993. Quantal analysis and synaptic anatomy — integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci.* 16, 141–147. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90122-3)
- Liu, D.J., Hammer, D., Komlos, D., Chen, K.Y., Firestein, B.L., Liu, A.Y.-C., 2014. SIRT1 Knockdown Promotes Neural Differentiation and Attenuates the Heat Shock Response. *J. Cell. Physiol.* 229, 1224–1235. <https://doi.org/10.1002/jcp.24556>
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., Wang, Y.T., 2004. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021–1024. <https://doi.org/10.1126/science.1096615>
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F., 1990a. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J. Neurosci.* 10, 1372–1379. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-04-01372.1990>
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F., 1990b. Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function. *Ann. Med.* 22, 247–252.
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F., 1989. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243, 1721–1724. <https://doi.org/10.1126/science.2467382>
- Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J.D., Shigemoto, R., Somogyi, P., 1996. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1488–1500.
- Lüscher, C., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Muller, D., 2000. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* 3, 545–550. <https://doi.org/10.1038/75714>
- Maccaferri, G., 2005. Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J. Physiol.* 562, 73–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.077081>
- Maccaferri, G., Lacaille, J.-C., 2003. Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications—making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci.* 26, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.002>
- Maguire, E.A., Burgess, N., Donnett, J.G., Frackowiak, R.S., Frith, C.D., O’Keefe, J., 1998. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280, 921–924.
- Makhinson, M., Chotiner, J.K., Watson, J.B., O’Dell, T.J., 1999. Adenylyl Cyclase Activation Modulates Activity-Dependent Changes in Synaptic Strength and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Autophosphorylation. *J. Neurosci.* 19, 2500–2510. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02500.1999>
- Malenka, R.C., 1991. The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* 5, 289–295.

- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A., Waxham, M.N., 1989. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340, 554–557. <https://doi.org/10.1038/340554a0>
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1999. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science* 285, 1870–1874. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1993. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* 16, 521–527. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90197-T](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90197-T)
- Malinow, R., 2003. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 707–714. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1233>
- Malinow, R., Schulman, H., Tsien, R.W., 1989. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245, 862–866. <https://doi.org/10.1126/science.2549638>
- Mameli, M., Zamudio, P.A., Carta, M., Valenzuela, C.F., 2005. Developmentally Regulated Actions of Alcohol on Hippocampal Glutamatergic Transmission. *J. Neurosci.* 25, 8027–8036. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2434-05.2005>
- Man, H.-Y., Sekine-Aizawa, Y., Huganir, R.L., 2007. Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3579–3584. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611698104>
- Manahan-Vaughan, D., Braunewell, K.-H., 1999. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8739–8744.
- Manzardo, A.M., Henkhaus, R.S., Butler, M.G., 2012. Global DNA promoter methylation in frontal cortex of alcoholics and controls. *Gene* 498, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.096>
- Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M., Sakmann, B., 1997. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213–215.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Nakanishi, S., 1991. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349, 760–765. <https://doi.org/10.1038/349760a0>
- Mathew, A., Mathur, S.K., Morimoto, R.I., 1998. Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5091–5098.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H., 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B., 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263.
- McGuier, N.S., Padula, A.E., Mulholland, P.J., Chandler, L.J., 2015. Homer2 deletion alters dendritic spine morphology but not alcohol-associated adaptations in GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus accumbens. *Front. Pharmacol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00028>
- McKernan, R.M., Whiting, P.J., 1996. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci.* 19, 139–143. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)80023-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)80023-3)
- McMillan, D.R., Christians, E., Forster, M., Xiao, X., Connell, P., Plumier, J.-C., Zuo, X., Richardson, J., Morgan, S., Benjamin, I.J., 2002. Heat shock transcription factor 2 is not essential for embryonic

- development, fertility, or adult cognitive and psychomotor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8005–8014.
- McQueeney, T., Schweinsburg, B.C., Schweinsburg, A.D., Jacobus, J., Bava, S., Frank, L.R., Tapert, S.F., 2009. Altered White Matter Integrity in Adolescent Binge Drinkers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 1278–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00953.x>
- McQuown, S.C., Barrett, R.M., Matheos, D.P., Post, R.J., Rogge, G.A., Alenghat, T., Mullican, S.E., Jones, S., Rusche, J.R., Lazar, M.A., Wood, M.A., 2011. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 764–774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011>
- Meng, Y., Zhang, Y., Jia, Z., 2003. Synaptic Transmission and Plasticity in the Absence of AMPA Glutamate Receptor GluR2 and GluR3. *Neuron* 39, 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00368-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00368-4)
- Mezger, V., Bensaude, O., Morange, M., 1989. Unusual levels of heat shock element-binding activity in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3888–3896.
- Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., Horikawa, I., 2005. Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol. Biol. Cell* 16, 4623–4635. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0033>
- Mihic, S.J., Whiting, P.J., Harris, R.A., 1994. Anaesthetic concentrations of alcohols potentiate GABAA receptor-mediated currents: lack of subunit specificity. *Eur. J. Pharmacol.* 268, 209–214.
- Minakami, R., Katsuki, F., Sugiyama, H., 1993. A Variant of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5: An Evolutionally Conserved Insertion with No Termination Codon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 622–627. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1866>
- Minucci, S., Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 38–51. <https://doi.org/10.1038/nrc1779>
- Monsey, M.S., Ota, K.T., Akingbade, I.F., Hong, E.S., Schafe, G.E., 2011. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PloS One* 6, e19958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019958>
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
- Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., Malenka, R.C., 2001. Regulation of Synaptic Strength by Protein Phosphatase 1. *Neuron* 32, 1133–1148. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00554-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00554-2)
- Morishita, W., Lu, W., Smith, G.B., Nicoll, R.A., Bear, M.F., Malenka, R.C., 2007. Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology, LTP: Forty Unforgettable Years. A Festschrift in Honour of Professor Tim Bliss FRS* 52, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.005>
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O’Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.

- Morrison, A.J., Rush, S.J., Brown, I.R., 2000. Heat shock transcription factors and the hsp70 induction response in brain and kidney of the hyperthermic rat during postnatal development. *J. Neurochem.* 75, 363–372.
- Naassila, M., 2018. Bases neurobiologiques de l'addiction à l'alcool. *Presse Médicale, Dossier thématique. Alcoolodépendance 1ère partie* 47, 554–564. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.12.001>
- Naassila, M., 2017. *Alcool : plaisir ou souffrance ? : Une question de santé publique.* Editions Le Muscadier.
- Naassila, M., Pierrefiche, O., 2018. GluN2B Subunit of the NMDA Receptor: The Keystone of the Effects of Alcohol During Neurodevelopment. *Neurochem. Res.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2462-y>
- Nagel, B.J., Schweinsburg, A.D., Phan, V., Tapert, S.F., 2005. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. *Psychiatry Res.* 139, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2005.05.008>
- Nagy, E., Balogi, Z., Gombos, I., Åkerfelt, M., Björkbom, A., Balogh, G., Török, Z., Maslyanko, A., Fiszler-Kierzkowska, A., Lisowska, K., Slotte, P.J., Sistonen, L., Horváth, I., Vígh, L., 2007. Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7945–7950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702557104>
- Neef, D.W., Jaeger, A.M., Thiele, D.J., 2011. Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 930–944. <https://doi.org/10.1038/nrd3453>
- Neher, E., Sakaba, T., 2008. Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron* 59, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.019>
- Nehring, S.M., Gossman, W.G., 2018. Alcohol Use Disorder, in: *StatPearls.* StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Nelson, E.C., Heath, A.C., Bucholz, K.K., Madden, P.A.F., Fu, Q., Knopik, V., Lynskey, M.T., Whitfield, J.B., Statham, D.J., Martin, N.G., 2004. Genetic Epidemiology of Alcohol-Induced Blackouts. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 257–263. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.3.257>
- Neyton, J., Paoletti, P., 2006. Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1331–1333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5242-05.2006>
- Nguyen, P.V., Abel, T., Kandel, E.R., 1994. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265, 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.8066450>
- Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1995. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377, 115–118. <https://doi.org/10.1038/377115a0>
- Nicoll, R.A., Schmitz, D., 2005. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 863–876. <https://doi.org/10.1038/nrn1786>
- Norris, C.M., Halpain, S., Foster, T.C., 1998. Reversal of Age-Related Alterations in Synaptic Plasticity by Blockade of L-Type Ca²⁺ Channels. *J. Neurosci.* 18, 3171–3179. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03171.1998>

Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D., 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6, 177–189.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–465.

Nozaki, C., Vergnano, A.M., Filliol, D., Ouagazzal, A.-M., Goff, A.L., Carvalho, S., Reiss, D., Gaveriaux-Ruff, C., Neyton, J., Paoletti, P., Kieffer, B.L., 2011. Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat. Neurosci.* 14, 1017–1022. <https://doi.org/10.1038/nn.2844>

Nutt, D.J., King, L.A., Phillips, L.D., Independent Scientific Committee on Drugs, 2010. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet Lond. Engl.* 376, 1558–1565. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61462-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61462-6)

O'Brien, R.J., Lau, L.F., Haganir, R.L., 1998. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 364–369.

Oh, M.C., Derkach, V.A., Guire, E.S., Soderling, T.R., 2006. Extrasynaptic Membrane Trafficking Regulated by GluR1 Serine 845 Phosphorylation Primes AMPA Receptors for Long-term Potentiation. *J. Biol. Chem.* 281, 752–758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509677200>

Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1993. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 53, 1009–1018. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90485-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90485-X)

Olsen, R.W., 2018. GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.036>

Olsen, R.W., Spigelman, I., 2012. GABAA Receptor Plasticity in Alcohol Withdrawal, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Ouyang, Y., Kantor, D., Harris, K.M., Schuman, E.M., Kennedy, M.B., 1997. Visualization of the Distribution of Autophosphorylated Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II after Tetanic Stimulation in the CA1 Area of the Hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 5416–5427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05416.1997>

Overstreet, L.S., Pasternak, J.F., Colley, P.A., Slater, N.T., Trommer, B.L., 1997. Metabotropic Glutamate Receptor Mediated Long-term Depression in Developing Hippocampus. *Neuropharmacology* 36, 831–844. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00031-2)

Palle C., « Alcool » dans OFDT, *Drogues et addictions, données essentielles*

Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J., 1997. High-Affinity Zinc Inhibition of NMDA NR1–NR2A Receptors. *J. Neurosci.* 17, 5711–5725. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05711.1997>

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>

Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., Oliet, S.H.R., 2012. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150, 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>

- Papouin, T., Oliet, S.H.R., 2014. Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0601>
- Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., Ehlers, M.D., 2004. Recycling Endosomes Supply AMPA Receptors for LTP. *Science* 305, 1972–1975. <https://doi.org/10.1126/science.1102026>
- Pascual, M., Boix, J., Felipo, V., Guerri, C., 2009. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *J. Neurochem.* 108, 920–931. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05835.x>
- Patterson, S.L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C., Kandel, E.R., 2001. Some Forms of cAMP-Mediated Long-Lasting Potentiation Are Associated with Release of BDNF and Nuclear Translocation of Phospho-MAP Kinase. *Neuron* 32, 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00443-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00443-3)
- Penney, J., Tsai, L.-H., 2014. Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci Signal* 7, re12–re12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa0069>
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X., Niedzielski, A.S., Wenthold, R.J., 1996. The metabotropic glutamate receptors, MGLUR2 and MGLUR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* 71, 949–976. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00533-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00533-1)
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E.V., Hedehus, M., Adalsteinsson, E., Lim, K.O., Moseley, M., 2000. In Vivo Detection and Functional Correlates of White Matter Microstructural Disruption in Chronic Alcoholism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb02086.x>
- Philpot, B.D., Cho, K.K.A., Bear, M.F., 2007. Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* 53, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.027>
- Philpot, B.D., Espinosa, J.S., Bear, M.F., 2003. Evidence for Altered NMDA Receptor Function as a Basis for Metaplasticity in Visual Cortex. *J. Neurosci.* 23, 5583–5588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05583.2003>
- Pierrefiche, O., 2017. Long Term Depression in Rat Hippocampus and the Effect of Ethanol during Fetal Life. *Brain Sci.* 7. <https://doi.org/10.3390/brainsci7120157>
- Pignataro, L., Miller, A.N., Ma, L., Midha, S., Protiva, P., Herrera, D.G., Harrison, N.L., 2007. Alcohol Regulates Gene Expression in Neurons via Activation of Heat Shock Factor 1. *J. Neurosci.* 27, 12957–12966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4142-07.2007>
- Pin, J.-P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)00129-G](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)00129-G)
- Pin, J.P., Waeber, C., Prezeau, L., Bockaert, J., Heinemann, S.F., 1992. Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10331–10335. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10331>
- Puglia, M.P., Valenzuela, C.F., 2010. Ethanol Acutely Inhibits Ionotropic Glutamate Receptor-mediated Responses and Long-Term Potentiation in the Developing CA1 Hippocampus. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34, 594–606. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01128.x>
- Qin, L., Ma, K., Wang, Z.-J., Hu, Z., Matas, E., Wei, J., Yan, Z., 2018. Social deficits in Shank3 -deficient mouse models of autism are rescued by histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Nat. Neurosci.* 21, 564–575. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0110-8>

- Qiu, S., Li, X.-Y., Zhuo, M., 2011. Post-translational modification of NMDA receptor GluN2B subunit and its roles in chronic pain and memory. *Semin. Cell Dev. Biol., Prions and Amyloids & Synapse and Brain* 22, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.06.003>
- Qiu, Z., Ghosh, A., 2008. A Calcium-Dependent Switch in a CREST-BRG1 Complex Regulates Activity-Dependent Gene Expression. *Neuron* 60, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.040>
- Rachline, J., Perin-Dureau, F., Goff, A.L., Neyton, J., Paoletti, P., 2005. The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. *J. Neurosci.* 25, 308–317. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-04.2005>
- Radke, A.K., Jury, N.J., Kocharian, A., Marcinkiewicz, C.A., Lowery-Gionta, E.G., Pleil, K.E., McElligott, Z.A., McKlveen, J.M., Kash, T.L., Holmes, A., 2017. Chronic EtOH effects on putative measures of compulsive behavior in mice. *Addict. Biol.* 22, 423–434. <https://doi.org/10.1111/adb.12342>
- Randall, R.D., Lee, S.Y., Meyer, J.H., Wittenberg, G.F., Gruol, D.L., 1995. Acute alcohol blocks neurosteroid modulation of synaptic transmission and long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 701, 238–248. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01007-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01007-9)
- Ren, H., Honse, Y., Peoples, R.W., 2003. A Site of Alcohol Action in the Fourth Membrane-associated Domain of the N-Methyl-D-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 48815–48820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302097200>
- Renthal, W., Maze, I., Krishnan, V., Covington, H.E., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Graham, A., Tsankova, N., Kippin, T.E., Kerstetter, K.A., Neve, R.L., Haggarty, S.J., McKinsey, T.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Nestler, E.J., 2007. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56, 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.032>
- Renthal, W., Nestler, E.J., 2009. Chromatin regulation in drug addiction and depression. *Dialogues Clin. Neurosci.* 11, 257–268.
- Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell* 40, 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- Risher, M.-L., Fleming, R.L., Risher, C., Miller, K.M., Klein, R.C., Wills, T., Acheson, S.K., Moore, S.D., Wilson, W.A., Eroglu, C., Swartzwelder, H.S., 2015. Adolescent Intermittent Alcohol Exposure: Persistence of Structural and Functional Hippocampal Abnormalities into Adulthood. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 989–997. <https://doi.org/10.1111/acer.12725>
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2003. Addiction. *Annu. Rev. Psychol.* 54, 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.54.101601.145237>
- Rolland, B., Naassila, M., 2017. Binge Drinking: Current Diagnostic and Therapeutic Issues. *CNS Drugs* 31, 181–186. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0413-4>
- Ron, D., Wang, J., 2009. The NMDA Receptor and Alcohol Addiction, in: Van Dongen, A.M. (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*, Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Ronald, K.M., Mirshahi, T., Woodward, J.J., 2001. Ethanol Inhibition of N-Methyl-d-aspartate Receptors Is Reduced by Site-directed Mutagenesis of a Transmembrane Domain Phenylalanine Residue. *J. Biol. Chem.* 276, 44729–44735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102800200>
- Sakharkar, A.J., Vetreno, R.P., Zhang, H., Kokare, D.M., Crews, F.T., Pandey, S.C., 2016. A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-

derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Struct. Funct.* 221, 4691–4703. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1196-y>

Salter, M.W., Kalia, L.V., 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 317–328. <https://doi.org/10.1038/nrn1368>

Sandqvist, A., Björk, J.K., Akerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc’h, C., Jolly, C., Salminen, T.A., Nymalm, Y., Sistonen, L., 2009. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol. Biol. Cell* 20, 1340–1347. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0864>

Schmauss, C., 2017. The roles of class I histone deacetylases (HDACs) in memory, learning, and executive cognitive functions: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.004>

Schneider, M., 2013. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res.* 354, 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1581-2>

Schwarzinger, M., Pollock, B.G., Hasan, O.S.M., Dufouil, C., Rehm, J., QalyDays Study Group, 2018. Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008-13: a nationwide retrospective cohort study. *Lancet Public Health* 3, e124–e132. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30022-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30022-7)

Scoville, W.B., Milner, B., 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 12, 103–113. <https://doi.org/10.1176/jnp.12.1.103>

Sen, N., 2015. Epigenetic Regulation of Memory by Acetylation and Methylation of Chromatin: Implications in Neurological Disorders, Aging, and Addiction. *NeuroMolecular Med.* 17, 97–110. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8306-x>

Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J.A., Malinow, R., 2001. Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Cell* 105, 331–343. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00321-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00321-X)

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1997. Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 7503–7522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07503.1997>

Shinkawa, T., Tan, K., Fujimoto, M., Hayashida, N., Yamamoto, K., Takaki, E., Takii, R., Prakasam, R., Inouye, S., Mezger, V., Nakai, A., 2011. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. *Mol. Biol. Cell* 22, 3571–3583. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0330>

Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., Shigemoto, R., 2008. Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19498–19503. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807461105>

Shipton, O.A., Paulsen, O., 2014. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0163>

Shu, G., Kramár, E.A., López, A.J., Huynh, G., Wood, M.A., Kwapis, J.L., 2018. Deleting HDAC3 rescues long-term memory impairments induced by disruption of the neuron-specific chromatin remodeling subunit BAF53b. *Learn. Mem.* 25, 109–114. <https://doi.org/10.1101/lm.046920.117>

- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M., Tonegawa, S., 1992. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 206–211. <https://doi.org/10.1126/science.1321493>
- 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. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv087>
- Simon-O'Brien, E., Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Buttolo, R., Naassila, M., Vilpoux, C., 2015. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate decreases excessive ethanol intake in dependent animals. *Addict. Biol.* 20, 676–689. <https://doi.org/10.1111/adb.12161>
- Singh, P., Thakur, M.K., 2018. Histone Deacetylase 2 Inhibition Attenuates Downregulation of Hippocampal Plasticity Gene Expression during Aging. *Mol. Neurobiol.* 55, 2432–2442. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0490-x>
- Sivilotti, L., Nistri, A., 1991. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36, 35–92. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90036-Z](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90036-Z)
- Smith, G.B., Olsen, R.W., 1994. Identification of a [3H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acidA receptor alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 20380–20387.
- Smothers, C.T., Jin, C., Woodward, J.J., 2013. Deletion of the N-terminal Domain (NTD) Alters the Ethanol Inhibition of NMDA Receptors in a Subunit-Dependent Manner. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37. <https://doi.org/10.1111/acer.12168>
- Solomon, R.L., Corbit, J.D., 1974. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol. Rev.* 81, 119–145.
- Soncin, F., Zhang, X., Chu, B., Wang, X., Asea, A., Ann Stevenson, M., Sacks, D.B., Calderwood, S.K., 2003. Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 700–706.
- Squeglia, L.M., Sorg, S.F., Schweinsburg, A.D., Wetherill, R.R., Pulido, C., Tapert, S.F., 2012. Binge drinking differentially affects adolescent male and female brain morphometry. *Psychopharmacology (Berl.)* 220, 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2500-4>
- Squire, L.R., 1992a. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *J. Cogn. Neurosci.* 4, 232–243. <https://doi.org/10.1162/jocn.1992.4.3.232>
- Squire, L.R., 1992b. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99, 195–231.
- Stanton, P.K., 1996. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6, 35–42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:1<35::AID-HIPO7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:1<35::AID-HIPO7>3.0.CO;2-6)
- Stefanko, D.P., Barrett, R.M., Ly, A.R., Reolon, G.K., Wood, M.A., 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9447–9452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106>
- Strack, S., Colbran, R.J., 1998. Autophosphorylation-dependent Targeting of Calcium/ Calmodulin-dependent Protein Kinase II by the NR2B Subunit of the N-Methyl- d-aspartate Receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 20689–20692. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.20689>

- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I., 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Strien, N.M. van, Cappaert, N.L.M., Witter, M.P., 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Sun, J.-M., Spencer, V.A., Chen, H.Y., Li, L., Davie, J.R., 2003. Measurement of histone acetyltransferase and histone deacetylase activities and kinetics of histone acetylation. *Methods San Diego Calif* 31, 12–23.
- Suvarna, N., Borgland, S.L., Wang, J., Phamluong, K., Auberson, Y.P., Bonci, A., Ron, D., 2005. Ethanol Alters Trafficking and Functional N-Methyl-D-aspartate Receptor NR2 Subunit Ratio via H-Ras. *J. Biol. Chem.* 280, 31450–31459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504120200>
- Swanson, L.W., Wyss, J.M., Cowan, W.M., 1978. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J. Comp. Neurol.* 181, 681–715. <https://doi.org/10.1002/cne.901810402>
- Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.04.001>
- Takács, V.T., Szőnyi, A., Freund, T.F., Nyiri, G., Gulyás, A.I., 2015. Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 220, 919–940. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0692-6>
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S., 1992. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8, 169–179. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90118-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90118-W)
- Tang, Y.-P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63–69. <https://doi.org/10.1038/43432>
- Thomas, G.M., Huganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183. <https://doi.org/10.1038/nrn1346>
- Tian, F., Hu, X.-Z., Wu, X., Jiang, H., Pan, H., Marini, A.M., Lipsky, R.H., 2009. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J. Neurochem.* 109, 1375–1388. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06058.x>
- Tian, F., Marini, A.M., Lipsky, R.H., 2010. NMDA receptor activation induces differential epigenetic modification of Bdnf promoters in hippocampal neurons. *Amino Acids* 38, 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0315-y>
- Tovar, K.R., Westbrook, G.L., 2002. Mobile NMDA Receptors at Hippocampal Synapses. *Neuron* 34, 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00658-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00658-X)
- Townshend, J.M., Duka, T., 2002. Patterns of alcohol drinking in a population of young social drinkers: a comparison of questionnaire and diary measures. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 37, 187–192.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>

- Tsai, G., Coyle, J.T., 1998. The Role of Glutamatergic Neurotransmission in the Pathophysiology of Alcoholism. *Annu. Rev. Med.* 49, 173–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.49.1.173>
- Tsumoto, T., 1993. Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of “forgetting” that should not be forgotten. *Neurosci. Res.* 16, 263–270. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(93\)90036-P](https://doi.org/10.1016/0168-0102(93)90036-P)
- Turrigiano, G.G., 2000. AMPA Receptors Unbound: Membrane Cycling and Synaptic Plasticity. *Neuron* 26, 5–8. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81131-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81131-9)
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Fujimoto, M., Otsuki, K., Yamagata, H., Hobar, T., Abe, N., Higuchi, F., Shibata, T., Hasegawa, S., Kida, S., Nakai, A., Watanabe, Y., 2011. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1681–1686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016424108>
- Uraz, S., Tahan, G., Aytekin, H., Tahan, V., 2013. N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 73, 61–66. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.734859>
- Vann, S.D., Nelson, A.J.D., 2015. Chapter 9 - The mammillary bodies and memory: more than a hippocampal relay, in: O’Mara, S., Tsanov, M. (Eds.), *Progress in Brain Research, The Connected Hippocampus*. Elsevier, pp. 163–185. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.006>
- Varodayan, F.P., Pignataro, L., Harrison, N.L., 2011. Alcohol induces synaptotagmin 1 expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *Neuroscience* 193, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.035>
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A., 2007. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6128–6140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007>
- Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, H.G., 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286–293. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00073-8)
- Verma, P., Pfister, J.A., Mallick, S., D’Mello, S.R., 2014. HSF1 Protects Neurons through a Novel Trimerization- and HSP-Independent Mechanism. *J. Neurosci.* 34, 1599–1612. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3039-13.2014>
- Vihervaara, A., Sergelius, C., Vasara, J., Blom, M.A.H., Elsing, A.N., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2013. Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3388–E3397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305275110>
- Waddington, C.H., 2012. The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Wafford, K.A., Burnett, D.M., Leidenheimer, N.J., Burt, D.R., Wang, J.B., Kofuji, P., Dunwiddie, T.V., Harris, R.A., Sikela, J.M., 1991. Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in xenopus oocytes requires 8 amino acids contained in the γ 2L subunit. *Neuron* 7, 27–33. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90071-7)
- Wang, G., Zhang, J., Moskophidis, D., Mivechi, N.F., 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *Genes. N. Y. N* 2000 36, 48–61. <https://doi.org/10.1002/gene.10200>

- Wang, J., Lanfranco, M.F., Gibb, S.L., Yowell, Q.V., Carnicella, S., Ron, D., 2010. Long-lasting adaptations of the NR2B-containing NMDA receptors in the dorsomedial striatum play a crucial role in alcohol consumption and relapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 10187–10198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2268-10.2010>
- Weaver, I.C.G., 2007. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. *Nature versus nurture: let's call the whole thing off. Epigenetics* 2, 22–28.
- Wechsler, H., Davenport, A., Dowdall, G., Moeykens, B., Castillo, S., 1994. Health and behavioral consequences of binge drinking in college. A national survey of students at 140 campuses. *JAMA* 272, 1672–1677.
- Wechsler, H., Isaac, N., 1992. “Binge” drinkers at Massachusetts colleges. Prevalence, drinking style, time trends, and associated problems. *JAMA* 267, 2929–2931.
- Weiner, J.L., Dunwiddie, T.V., Valenzuela, C.F., 1999. Ethanol Inhibition of Synaptically Evoked Kainate Responses in Rat Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons. *Mol. Pharmacol.* 56, 85–90. <https://doi.org/10.1124/mol.56.1.85>
- Westerheide, S.D., Ankar, J., Stevens, S.M., Sistonen, L., Morimoto, R.I., 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063–1066. <https://doi.org/10.1126/science.1165946>
- White, A.M., 2003. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 27, 186–196.
- Wilson, S., Bair, J.L., Thomas, K.M., Iacono, W.G., 2017. Problematic alcohol use and reduced hippocampal volume: a meta-analytic review. *Psychol. Med.* 47, 2288–2301. <https://doi.org/10.1017/S0033291717000721>
- Wirkner, K., Eberts, C., Poelchen, W., Allgaier, C., Illes, P., 2000. Mechanism of inhibition by ethanol of NMDA and AMPA receptor channel functions in cultured rat cortical neurons. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 568–576.
- Wisden, W., Seeburg, P.H., 1993. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 13, 3582–3598. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-08-03582.1993>
- Wise, R.A., 1978. Catecholamine theories of reward: A critical review. *Brain Res.* 152, 215–247. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90253-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90253-6)
- Woldemichael, B.T., Bohacek, J., Gapp, K., Mansuy, I.M., 2014. Epigenetics of memory and plasticity. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 122, 305–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00011-8>
- Wright, J.M., Peoples, R.W., Weight, F.F., 1996. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res.* 738, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00780-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00780-9)
- Wu, C., 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 441–469. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002301>
- Yaka, R., Phamluong, K., Ron, D., 2003. Scaffolding of Fyn Kinase to the NMDA Receptor Determines Brain Region Sensitivity to Ethanol. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3623–3632.

- Yashiro, K., Philpot, B.D., 2008. Regulation of NMDA Receptor Subunit Expression and Its Implications for LTD, LTP, and Metaplasticity. *Neuropharmacology* 55, 1081–1094. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.046>
- Yuan, Z.-L., Guan, Y.-J., Chatterjee, D., Chin, Y.E., 2005. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307, 269–273. <https://doi.org/10.1126/science.1105166>
- Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2001. Morphological Changes in Dendritic Spines Associated with Long-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1071–1089. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1071>
- Zahr, N.M., Pfefferbaum, A., 2017. Alcohol's Effects on the Brain: Neuroimaging Results in Humans and Animal Models. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 38, 183–206.
- Zhang, H., Kyzar, E.J., Bohnsack, J.P., Kokare, D.M., Teppen, T., Pandey, S.C., 2018. Adolescent alcohol exposure epigenetically regulates CREB signaling in the adult amygdala. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28415-9>
- Zhao, J.-P., Constantine-Paton, M., 2007. NR2A^{-/-} mice lack long-term potentiation but retain NMDA receptor and L-type Ca²⁺ channel-dependent long-term depression in the juvenile superior colliculus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13649–13654. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3153-07.2007>
- Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2012. NMDA receptors and metaplasticity: mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 989–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.011>
- Zorumski, C.F., Mennerick, S., Izumi, Y., 2014. Acute and Chronic Effects of Ethanol on Learning-Related Synaptic Plasticity. *Alcohol Fayettev. N* 48, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.09.045>
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R., 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480.
- Zou, J.Y., Crews, F.T., 2014. Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PloS One* 9, e87915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087915>
- Zucker, R.S., Regehr, W.G., 2002. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>

