Implication de l'épigénétique et de la neuroinflammation dans les atteintes cognitives induites par les premières intoxications éthyliques chez le rat adolescent

Chloé Deschamps

▶ **To cite this version:**

Chloé Deschamps. Implication de l'épigénétique et de la neuroinflammation dans les atteintes cognitives induites par les premières intoxications éthyliques chez le rat adolescent. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0001 . tel-03696686

HAL Id: tel-03696686

https://theses.hal.science/tel-03696686

Submitted on 16 Jun 2022

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

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

Thèse de Doctorat

Mention Biologie
Spécialité Neurosciences

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

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Chloé DESCHAMPS

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

Implication de l'épigénétique et de la neuroinflammation dans les atteintes cognitives induites par les premières intoxications éthyliques chez le rat adolescent

Soutenue le 6 mai 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M^me^ BELZUNG Catherine, Professeure des Universités, Tours	**Présidente du jury**
M. DAVID Vincent, Chargé de Recherches CNRS, Bordeaux	**Rapporteur**
M. QUERTEMONT Etienne, Professeur des Universités, Liège	**Rapporteur**
M. NAASSILA Mickaël, Professeur des Universités, Amiens	**Directeur de thèse**
M. PIERREFICHE Olivier, Professeur des Universités, Amiens	**Directeur de thèse**

GROUPE DE RECHERCHE SUR L'ALCOOL & LES PHARMACODÉPENDANCES

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Cette thèse a été réalisée au sein du Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances (GRAP), INSERM UMR 1247, situé au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université de Picardie Jules Verne, Chemin du Thil, 80000 Amiens.

L'allocation de recherche dont j'ai bénéficié pendant ces 3 années a été accordée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury,

Le **Dr. Vincent David**, Chargé de Recherches CNRS et membre de l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine de Bordeaux,

Le **Pr. Etienne Quertemont**, Professeur à l'Université de Liège et membre de l'unité de recherche PsyNCog,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et de consacrer du temps à mes travaux de recherche.

Le **Pr. Catherine Belzung**, Professeure à l'Université de Tours et Directrice de l'unité Inserm 1253 Imagerie et Cerveau, qui me fait l'honneur d'être examinatrice de ce travail.

Le **Pr. Mickaël Naassila**, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne, Directeur du laboratoire et directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir intégré au sein de votre équipe, de m'avoir consacré du temps alors même que vous en manquiez. Evidemment je retiens votre franc-parler qui m'a dérouté plus d'une fois mais qui m'a toujours été bénéfique. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et partagé votre expertise. Vous m'avez offert l'opportunité de participer à des congrès et présenter mes travaux de recherche, à plusieurs reprises, ainsi que de participer à des sessions de vulgarisation scientifique et d'autres formations. Je termine cette thèse riche de ces expériences.

Le **Pr. Olivier Pierrefiche**, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne et directeur de thèse. C'est une chance d'être formé par une personne aussi investie et passionnée que vous. Merci pour votre pédagogie, votre disponibilité sans faille (même le soir, même le week-end !), votre soutien et votre confiance. Merci également de m'avoir secouée, quand il le fallait, pour que j'aille au-delà dans mes réflexions et travaux. Vous m'avez donné l'opportunité d'encadrer des stagiaires, à plusieurs reprises, mais également d'enseigner. Ces expériences m'ont permis de conforter mes connaissances et de gagner en confiance. Ces quelques lignes ne suffisent pas à exprimer toute ma reconnaissance mais merci de m'avoir menée jusqu'ici et j'espère que vous m'aurez encore dans les pattes quelques temps !

Dans un deuxième temps, je remercie les membres du laboratoire qui ont participé à mes travaux,

Le Dr. Catherine Vilpoux, merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Vous m'avez apporté une précieuse aide pour les statistiques, et vous m'avez formée aux perfusions transcardiaques, mais aussi aux petites blagues de type carboglace/liquide vaisselle…

Le Dr. Jérôme Jeanblanc, merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, et pour les bons moments partagés au laboratoire et en congrès. Merci pour tout ce que tu m'as apporté en expérimentation animale, et de m'avoir formée au prélèvement de structures cérébrales (bien que la substance noire manquait à l'appel ! Oups). Merci pour ta bonne humeur et ton soutien.

Merci au Dr. Ingrid Marcq, d'avoir pris part à nos projets et pour votre disponibilité. Merci aux Dr. Constance Marié et Grégory Fouquet, pour votre participation aux projets, mais aussi pour tous les autres moments que l'on a passé ensemble ! Constance, nous avons débuté notre thèse en même temps et voilà que tu as soutenu il y a quelques jours … c'était un plaisir de partager ce périple avec toi. J'espère que tu t'épanouiras dans cette nouvelle vie d'après thèse ! Greg, merci pour ton aide durant ces 3 années, et merci de m'avoir accompagnée lors des manips et surtout lors de la fameuse série de prélèvements la nuit. Il faut bien avouer que peu de personnes se seraient infligé ça… mais c'est un bel exemple de travail d'équipe !

J'adresse également toute ma reconnaissance aux membres de la plateforme animalerie, Julie Le Ber, Anaïs Jovelet et Virginie Jeanblanc, dont le travail est primordial pour le bon déroulement de nos expériences. Les problèmes techniques du bâtiment nous auront donné du fil à retordre mais vous avez toujours fait preuve d'une réactivité sans faille !

Je réserve un mot aux stagiaires qui ont transité par le laboratoire. J'ai une pensée toute particulière pour Floriane et Margot, que j'ai encadrées dès la L3 et jusqu'en M2, et qui sont désormais toutes les deux en thèse. Quelle chance j'ai eu de tomber sur vous ! Vous avec appris tellement vite … Floriane, nous avons passé quelques soirées au labo à essorer les animaux jusqu'à la dernière tranche (peut-être pas suffisamment pour que Uber Eats trouve le chemin rapidement !) et au fil des pannes nous sommes des professionnelles du transfert d'échantillons et du déménagement de congélos… Je te souhaite beaucoup de réussite à Bordeaux. Margot, tu fais preuve d'une dévotion hors norme qui, j'en suis sure, te mènera

loin. On a partagé beaucoup de moments de rires, quelques uns de détresse et tu es devenue une vraie amie. J'écris ces lignes au moment même où le contrôleur de température du poste 2 te dupe et je te vois souriante et optimiste, alors je me dis que ma mission est accomplie ! L'électrophy c'est de la frustration mais les résultats n'en sont que plus beaux ! Je te souhaite évidemment le meilleur pour la suite.

Je voudrais remercier les thésards, Quentin et Charles, avec qui j'ai partagé beaucoup de temps en salle d'électrophysiologie, pour tous les moments passés ensemble, les discussions, les repas et les pauses au soleil ! Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

J'ai une pensée pour les anciens doctorants du laboratoire, le Dr. Ichrak Drissi qui m'a donné le goût de l'électrophy ! Merci pour la formation et de m'avoir donné toutes les clés pour mener à bien cette thèse mais aussi pour ton soutien sans faille durant mon M2. Je pense également aux Dr. Kévin Rabiant, Cédric Bertrand et Pierre Sauton qui ont tous participé à ma formation au sein du labo et avec qui j'ai travaillé. Merci pour votre aide, votre soutien, votre bienveillance et les discussions scientifiques. Je vous souhaite le meilleur pour vos futurs projets de vie.

Je n'oublie pas Johann Antol, « maître du carbogène » sans qui nous électrophysiologistes ne sommes plus rien ! Une pensée pour Elodie, « EloPec », tu étais le premier sourire qui m'était adressé le matin à 8h ! J'ai également une pensée pour Hakim qui veille à ce que l'on ne perde pas de poids… Je remercie également tous les autres membres du laboratoire avec qui j'ai partagé de bons moments.

Je remercie du fond du cœur mes parents qui m'ont placé dans des conditions optimales pour mener à bien mes projets et qui m'ont toujours accompagnée et soutenue tout au long de mon parcours.

J'adresse un mot tout particulier pour Maurty, en première ligne depuis déjà plusieurs années. Tu m'encourages dans tout ce que j'entreprends, malgré les répercussions que cela peut avoir sur toi. Merci de m'avoir accompagné et encouragé tout au long de cette aventure.

Je ne pouvais pas terminer sans remercier mes meilleurs copains : Justine, Cindy, Solenne, Elodie, Mika. Vous avez subi par procuration les aléas de la thèse et vous avez essuyé quelques larmes. Notre amitié a persisté malgré de multiples évènements et je tenais à vous remercier pour votre soutien indéfectible.

LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

Articles dans des revues à comité de lecture international

6) Deschamps C, Uyttersprot F, Debris M, Marié C, Fouquet G, Marcq I, Vilpoux C, Naassila M, Pierrefiche O (n.d.). *Anti-inflammatory drugs prevent memory and hippocampal plasticity deficits following initial binge-like alcohol exposure in adolescent male rats.* Accepté dans Psychopharmacology.

5) Vilpoux C, Fouquet G, Deschamps C, Lefebvre E, Gosset P, Antol J, Zabijak L, Marcq I, Naassila M, Pierrefiche O. *Astrogliosis and compensatory neurogenesis after the very first ethanol binge drinking-like exposures in adolescent rat.* Alcohol Clin Exp Res. 2021 Dec 3. doi: 10.1111/acer.14757. Epub ahead of print. PMID: 34862633.

4) Bertrand C*, Deschamps C**, Rabiant K, Peineau S, Antol J, Martinetti M, Naassila M, Vilpoux C, Pierrefiche O. *Patch-Clamp Recording of Low Frequency Stimulation-induced Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Slices During Early and Late Neurodevelopment*. Alcohol Clin Exp Res. 2021 Feb;45(2):351-364. doi: 10.1111/acer.14516. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33196109. *co-auteurs

3) Sauton P*, Deschamps C**, Jeanblanc V, Pierrefiche O, Jeanblanc J, Naassila M. *Interstrain differences in voluntary binge-like drinking behavior and in two acute ethanol injections-induced synaptic plasticity deficits in rats.* Addict Biol. 2021 Jul;26(4):e12992. doi: 10.1111/adb.12992. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33331070. *co-auteurs

2) Drissi I, Deschamps C, Alary R, Robert A, Dubreuil V, Le Mouël A, Mohammed M, Sabéran-Djoneidi D, Mezger V, Naassila M, Pierrefiche O. *Role of heat shock transcription factor 2 in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus.* Addict Biol. 2021 Mar;26(2):e12939. doi: 10.1111/adb.12939. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32720424.

1) Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, Alary R, Peineau S, Gosset P, Sueur H, Marcq I, Debuysscher V, Naassila M, Vilpoux C, Pierrefiche O. *Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits*

imbalance through HDAC2. Addict Biol. 2020 May;25(3):e12760. doi: 10.1111/adb.12760. Epub 2019 May 6. PMID: 31056842.

Communications orales

2) **European Society for Biomedical Research on Alcoholism** (Timisoara, Roumanie, octobre 2021) : *"Memory and synaptic plasticity impairment after the very fisrt binge drinking episodes in adolescent rats: is there a link between inflammation and glutamate?"* C. Deschamps, F. Uyttersprot, M. Debris, C. Marié, G. Fouquet, I. Marcq, C. Vilpoux, M. Naassila, O. Pierrefiche.
1) **Congrès International d'Addictologie de l'Albatros** (Paris, octobre 2020) : *"*Anti-inflammatoires et prévention des déficits cognitifs induits par le *binge drinking* chez l'adolescent.*"* C. Deschamps, F. Uyttersprot, C. Vilpoux, M. Naassila, O. Pierrefiche.

Communications affichées

6) **GREPACO Groupe de Réflexion en Psychopathologie Cognitive** (colloque virtuel, juin 2021) : *"Perturbation de la mémoire et de la plasticité synaptique dès les premiers épisodes de binge drinking chez le rat adolescent : existe-t-il un lien entre inflammation et glutamate ? "* C. Deschamps, F. Uyttersprot, M. Debris, C. Marié, G. Fouquet, I. Marcq, C. Vilpoux, M. Naassila, O. Pierrefiche.
5) **Neurofrance 2021, Société des Neurosciences** (congrès international virtuel, mai 2021): *"Neuroinflammation is involved in the delayed effects of the very first ethanol binge episodes during adolescence on memory and CA1 hippocampal synaptic plasticity.*" C. Deschamps, F. Uyttersprot, M. Debris, C. Marié, G. Fouquet, I. Marcq, C. Vilpoux, M. Naassila, O. Pierrefiche.
4) **Société Française d'Alcoologie** (Paris, mars 2020) : *"La neuroinflammation participe aux déficits mnésiques observés chez le rat adolescent après seulement deux intoxications à l'alcool."* C. Deschamps, F. Uyttersprot, C. Vilpoux, M. Naassila, O. Pierrefiche.

3) **European Society for Biomedical Research on Alcoholism** (Lille, septembre 2019): "*Involvement of neuroinflammation in the effects of two ethanol binge episodes during adolescence on CA1 hippocampal synaptic plasticity*." Deschamps C., Vilpoux C., Naassila M., Pierrefiche O.
2) **Société Française d'Alcoologie** (Amiens, mars 2019) : "*Déficits de la mémoire après deux intoxications à l'alcool pendant l'adolescence : rôle de l'épigénétique et du glutamate.*" Deschamps C., Drissi I., Alary R., Peineau S., Vilpoux C., Naassila M., Pierrefiche O.
1) **Congrès International LARC Neurosciences** (Rouen, octobre 2018) : "*Two ethanol binge drinking episodes impair memory through epigenetic and GluN2B subunits.*" Deschamps C., Drissi I., Alary R., Peineau S., Vilpoux C., Naassila M., Pierrefiche O.

Prix

Young Investigator Award, European Society for Biomedical Research on Alcoholism (Timisoara, Roumanie, octobre 2021)

Encadrement

L'encadrement de plusieurs stagiaires tous issus de l'Université Picardie Jules Verne, m'a été confié durant ces trois années de thèse : les étudiants provenaient de L3 Biologie Humaine et Technologies de la Santé (BHTS) (Margot Debris) ou SVT (Zoé Gerbet), de Master 1 Biologie Santé (Margot Debris, Stella Carbonel-Rabocelli), de Master 2 Biologie Santé (Floriane Uyttersprot, Margot Debris) et de Master 1 MEEF (Etienne Niespodziany, Kévin Wheeler, Ammar Guedri, Lucas Pataille, Cynthia Caillier et Mélina Huray).

J'ai également encadré deux collégiens et deux lycéens dans le cadre du dispositif MAAD digital (Mécanismes d'Addiction à l'Alcool et aux Drogues), initié par l'INSERM, pendant l'année scolaire 2018/2019.

Enseignement

J'ai bénéficié en 2ème et 3ème année d'un Contrat Doctoral Elargi avec mission d'enseignement. J'ai donné 64h de TD en Licence 3 dans le département de Psychologie. Ces TD portaient sur le système nerveux, le potentiel d'action, la plasticité synaptique et les différents types d'apprentissage. Je bénéficie actuellement (2021-2022) d'un contrat d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) dans la section 69 Neurosciences à l'UFR des Sciences Humaines, sociales et Philosophie, dans le département de Psychologie.

L'ALCOOL ENCHAINE TON CERVEAU !
DEMAIN APRES-MIDI T'ES DISPO POUR REVISER LES PARTIELS?
HAPPY HOUR 18H-20H
EUH, PLUTÔT APRES DEMAIN, ÇA RISQUE D'ETRE UN PEU DUR DEMAIN...
IL RESTE 5MIN AVANT LA FIN DU HAPPY HOUR! SERVEUR! ENVOIE 3 SHOOTERS S'TE PLAIT!
BON, J'VAIS TE RAMENER... ENCORE UNE FOIS!
DEUX JOURS PLUS TARD---
HEUREUSEMENT QU'ON A PAS REVISÉ HIER, JE SUIS RESTÉ EMPAILLE!
QUELLE EST LA STRUCTURE CEREBRALE IMPLIQUÉE DANS LA MEMOIRE?
L'HIPPOCAMPE!
LE JOUR DES RESULTATS---
J'AI CARTONNÉ!
C'EST INJUSTE-
C'EST BIZARRE, ON A REVISÉ ENSEMBLE POURTANT...
ADMIS
AJOURNÉ
?
Google
Google
échec scolaire : causes
1. Echec scolaire, alcool et jeune adulte
Des travaux ont mis en evidence un lien entre le binge drinking (atteindre l'ivresse le plus rapidement possible) et des déficits de mémorisation chez le rat jeune adulte.
LE BINGE DRINKING ENTRAINE UNE INFLAMMATION DE L'HIPPOCAMPE. CETTE NEUROINFLAMMATION EMPECHE TA MEMOIRE DE FONCTIONNER. IL N'Y A PLUS D'ESPACE DE STOCKAGE DISPONIBLE. C'EST UN PEU COMME UN CADENAS---
NEUROINFLAMMATION
ET SI C'ETAIT MES IVRESSES REPETÉES LE PROBLÈME?
TU PRENDS QU'UN VERRE? T'ES MALADE OU QUOI?
HAPPY HOUR 18H-20H
PAS D'EXCES, JE SUIS EN RATTRAPAGES LA SEMAINE PROCHAINE
GRAP INSERM UNR 1247
Chloé DESCHAMPS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 2

Chapitre I Place de la consommation d'alcool dans notre société **3**
- **1- Les niveaux de consommation d'alcool en France** 5
- **2- Consommation d'alcool : les conséquences** 6
- **3- De l'usage contrôlé au trouble de l'usage de l'alcool** 6
- **4- Cas particulier de la consommation d'alcool chez les jeunes** 10
- **5- Précisions sur le phénomène de *binge drinking*** 11
- **6- Alcoolisation chez les jeunes : les conséquences** 13

Chapitre II L'hippocampe **17**
- **1- Rappels anatomiques** 17
- **2- Implication de l'hippocampe dans les processus physiologiques d'apprentissage et de mémoire** 21
- **3- Mémoire et apprentissage à l'échelle du neurone : transmission et plasticité synaptique** 27
  - *a) Les récepteurs impliqués dans la transmission synaptique* 28
  - *b) Le phénomène de plasticité synaptique* 34
- **4- Effets de l'alcoolisation aiguë et chronique dans les tests d'apprentissage chez le rongeur** 43
- **5- Effets de l'alcoolisation aiguë et chronique sur la plasticité synaptique chez le rongeur** 51
  - *a) Effets de l'éthanol ex vivo* 51
  - *b) Effets de l'éthanol in vivo* 52

Chapitre III Les mécanismes épigénétiques **56**
- **1- Généralités** 56
- **2- Implication des mécanismes épigénétique dans la mémoire** 61
- **3- Implication de l'épigénétique dans la plasticité synaptique** 66
- **4- Rôle de l'épigénétique dans les TUA** 69
  - *a) Modèles cellulaires d'exposition à l'éthanol* 69
  - *b) Effets de l'éthanol sur l'épigénétique dans les modèles animaux* 70

Chapitre IV Les processus de neuroinflammation **75**
- **1- Généralités** 75
- **2- Neuroinflammation, mémoire et plasticité synaptique** 81
- **3- Neuroinflammation et éthanol** 90
  - *a) Ethanol et neuroinflammation chez l'Homme* 90
  - *b) Neuroinflammation, alcool et modèles cellulaires* 91
  - *c) Implication de la neuroinflammation chez le rongeur exposé à l'éthanol* 93

QUESTIONS SCIENTIFIQUES 104

MATERIELS ET METHODES 106

I- Animaux **107**

II- Protocole d'alcoolisation et traitements pharmacologiques 107

III- Protocoles expérimentaux 109
1- Electrophysiologie de champ 109
a) Préparation des tranches 109
b) Enregistrements 110
c) Analyse des signaux électrophysiologiques 113
2- Test de reconnaissance de nouvel objet 114
3- Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel 116
4- Western Blot 116
5- Activité HDAC 117
6- Cytométrie en flux 117
7- Immunohistochimie 118

RESULTATS 120
Article 1 122
Article 2 149
Article 3 169

DISCUSSION 186

I- Les effets d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol sur les processus mnésiques hippocampo-dépendants et le récepteur NMDA 190
1- Choix du modèle d'exposition à l'éthanol 190
2- Ethanol, mémoire et plasticité synaptique dans l'hippocampe 192
a) Effets de l'éthanol sur les processus cognitifs 192
b) Modulation de la plasticité synaptique dans l'hippocampe par l'éthanol 194
3- Ethanol, sous-unités NMDA et plasticité dans l'hippocampe 198
a) Effet de l'éthanol sur la sous-unité GluN2B 198
b) Comment la DLT est-elle abolie 48h après deux expositions à l'éthanol ? 201

II- Implication des mécanismes épigénétiques et neuroinflammatoires dans les effets de deux épisodes d'intoxication éthylique à l'adolescence 204
1- Implication de mécanismes épigénétiques 205
a) Effet de l'exposition à l'éthanol sur les processus épigénétiques 205
b) Modulations épigénétiques et perturbations mnésiques 206
c) HDAC2 et mémoire 207
d) Modulation de GluN2B par HDAC2 209
2- La réaction neuroinflammatoire suite à deux expositions à l'éthanol 211
a) L'éthanol déclenche des processus neuroinflammatoires 211
b) Implication de la neuroinflammation dans les perturbations cognitives induites par l'éthanol 217
c) Influence de la neuroinflammation sur l'expression de GluN2B 219
3- Quel serait le lien entre neuroinflammation et épigénétique ? 220

III- Nos résultats dans la problématique des troubles de l'usage de l'alcool 222

IV- Perspectives 225
1- Confirmer l'implication de GluN2B dans les effets des deux intoxications éthyliques sur la mémoire 225
2- Vers l'hypothèse d'une implication de GluA2 dans les effets de quelques *binges* ? 226

3- Des expositions initiales de type *binge drinking* aux expositions répétées 230

CONCLUSION GENERALE 234

RESULTATS ANNEXES 236

AUTRES TRAVAUX REALISES PENDANT LA THESE 238

RÉFÉRENCES 292

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pyramide d'évaluation de l'usage d'alcool..... 7
Figure 2 : Coupe frontale d'un hippocampe de rongeur..... 18
Figure 3 : Représentation du circuit trisynaptique de l'hippocampe. 19
Figure 4 : Représentation d'un neurone pyramidal dans différentes couches des régions CA3/CA1 de l'hippocampe. 20
Figure 5 : Taxonomie des systèmes de mémoires à long terme chez le mammifère et les structures cérébrales associées..... 22
Figure 6 : Présentation schématique des différents tests de mémoire hippocampo-dépendante chez le rongeur.. 26
Figure 7 : Le récepteur NMDA : association des sous-unités et profil d'expression..... 31
Figure 8 : Le déclenchement de la DLT dans CA1 dépend du protocole de stimulation électrique.. ... 39
Figure 9 : Représentation schématique des différents processus impliqués dans la plasticité synaptique bidirectionnelle dépendante des récepteurs NMDA**.** 40
Figure 10 : Composition en sous-unités du récepteur NMDA et métaplasticité. 42
Figure 11 : Structure du nucléosome par radiocristallographie. 57
Figure 12 : Le remodelage de la chromatine par acétylation/désacétylation**.** 59
Figure 13: Exemple de réactivité microgliale dans l'hippocampe de rat par immunofluorescence..... 78
Figure 14 : Exemple de réactivité astrocytaire dans le gyrus denté chez la souris, par immunofluorescence..... 80
Figure 15 : Les différents protocoles d'exposition intermittente de type *binge drinking* utilisés dans les travaux portant sur la neuroinflammation. 100
Figure 16 : Protocole d'injection utilisé. 108
Figure 17 : Représentation des tranches d'hippocampes dorsaux générées pour les expériences... 110
Figure 18 : Photographie d'une tranche d'hippocampe dorsal sur laquelle sont schématisés le circuit trisynaptique de l'hippocampe et l'emplacement des électrodes de stimulation et d'enregistrement.. 112
Figure 19 : Déroulement du test de reconnaissance de nouvel objet. 115
Figure 20 : Schéma de synthèse des résultats obtenus lors de ce travail de thèse..... 189
Figure 21 : Corrélation entre performance mnésique dans le labyrinthe en Y et amplitude de DLT dans le gyrus denté. 195
Figure 22 : BCM de Paoletti et coll. (2013) adaptée par C. Deschamps aux résultats du présent travail de thèse..... 203
Figure 23 : La sous-unité GluA2 module l'amplitude de la plasticité synaptique NMDA-dépendante dans CA1..... 228
Figure 24 : Schéma représentant les différentes hypothèses abordées au cours de cette discussion. 229

LISTE DES TABLES

Table 1 : Les 11 critères du DSM-5 pour le diagnostic du TUA. 8

Table 2 : Définitions du binge drinking en fonction des Organismes. 12

Table 3 : Pharmacologie du récepteur NMDA. 32

Table 4 : Les effets de l'éthanol sur les processus cognitifs hippocampo-dépendants..... 50

Table 5 : Les cinq familles de HAT chez les mammifères. 59

Table 6 : Les différents isoformes de HDAC chez les mammifères. 60

Table 7 : Quelques iHDAC et leurs cibles. 61

Table 8 : Les effets d'une exposition à l'éthanol sur les mécanismes épigénétiques de type acétylation/désacétylation..... 74

Table 9 : Les principales cytokines pro- et anti-inflammatoires et leurs abréviations. 76

Table 10 : Les effets d'une exposition à l'éthanol sur les processus neuroinflammatoires.....101

Table 11 : Composition des solutions de coupe et de liquide céphalo-rachidien artificiel en millimolaire..... 109

Table 12 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR..... 116

Table 13 : Liste des anticorps utilisés pour la réalisation des marquages en immunohistochimie. ... 119

Table 14 : La mesure des cytokines inflammatoires à différents points temporels suite à une exposition unique à l'EtOH chez des animaux adultes..... 215

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPA : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

AMPc : AMP cyclique

API : Alcoolisation Ponctuelle Importante

AUDIT : Questionnaire d'identification du trouble de l'usage d'alcool

AUQ : *Alcohol Use Questionnaire*

BCM : Bienenstock-Cooper-Munro

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CA : Corne d'Ammon

CAMKII : Protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline

CREB : *cAMP response element binding*

DAMPs : *Damage associated molecular patterns*

DLT : Dépression à long terme

DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

EtOH : Ethanol

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GD : Gyrus denté

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone désacétylase

i.c.v. : Intra-cérébro-ventriculaire

i.g. : Intra-gastrique

i.h. : Intra-hippocampe

i.p. : Intra-péritonéal

iHDAC : Inhibiteur HDAC

INDO : Indométhacine

KO : *Knock-out*

LFS : *Low frequency stimulation*

MAPK : Protéines kinases activée par des agents mitogènes

MCT : Mémoire à court terme

mGluR : Récepteur métabotropique au glutamate

MINO : Minocycline

MLT : Mémoire à long terme

NaB : Butyrate de Sodium

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NSF : *N-ethylmaleimide-sensitive factor*

PAMPs : *Pathogen-associated molecular patterns*

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLT : Potentialisation à long terme

PP1 : Protéine phosphatase 1

pLFS : *Paired pulse low frequency stimulation*

PPSE : Potentiel post-synaptique excitateur

PPSI : Potentiel post-synaptique inhibiteur

PRR : *Pattern recognition receptor*

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RdRD : Réduction des risques et des dommages

SBF : Stimulations basse fréquence

SHF : Stimulations haute fréquence

TLR : *Toll-like receptor*

TSA : Trichostatine A

TUA : Trouble de l'Usage d'Alcool

RESUME ETENDU

Le *binge drinking* est un mode de consommation d'alcool (éthanol) banalisé chez les adolescents et les jeunes adultes et il est responsable de diverses atteintes cérébrales et cognitives ainsi que d'un risque accru de développer une addiction à l'alcool à l'âge adulte. Cependant, si ces effets à long terme sont bien répertoriés, les mécanismes relayant les effets de l'éthanol au niveau cérébral restent encore mal connus, notamment dans le cas d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol de type *binge drinking*, alors même que les adolescents ne sont pas conscients du danger pour le fonctionnement cérébral. De plus, ce faible nombre d'épisodes de *binge*, qui correspond finalement aux premières intoxications expérimentées par le sujet, pourrait déclencher des événements cellulaires et moléculaires qui pourraient être les éléments de base des perturbations neuronales à long-terme, qui s'expriment chez l'adulte. Ainsi, dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont attachés à mieux comprendre les mécanismes cellulaires affectés par l'éthanol et responsables des pertes de mémoire après un nombre restreint d'épisodes de *binge drinking*. Dans des études précédentes, notre laboratoire a démontré chez le rat adolescent que des déficits mnésiques survenaient 48h après seulement deux épisodes de type *binge drinking* (éthanolémie 2g/L), en même temps qu'une abolition de la plasticité synaptique de type dépression à long terme (DLT) – un mécanisme cellulaire de la mémoire – mesurée par techniques d'électrophysiologie extracellulaire dans le champ CA1 de tranches d'hippocampe. L'un des principaux acteurs dans le déclenchement de la plasticité synaptique est le récepteur ionotropique au glutamate de type NMDA (*N*-méthyl-D-Aspartate). De manière intéressante, les altérations précédemment décrites étaient accompagnées d'une augmentation de la sensibilité pharmacologique du potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) dépendant du R-NMDA à un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B qui compose ce récepteur, suggérant une modification du rôle de cette sous-unité après les *binges* (Silvestre de Ferron et al., 2015). Ces travaux antérieurs novateurs dans le domaine, laissaient toutefois en suspens les questions de savoir par quel(s) mécanisme(s) l'éthanol modifie le rôle de la sous-unité GluN2B et entraine les perturbations de plasticité synaptique et d'apprentissage précédemment rapportées. Parmi les mécanismes cellulaires pressentis et qui pourraient être responsables de ce changement de rôle de GluN2B, l'épigénétique apparait comme un bon candidat et j'ai, au début de ma

thèse, contribué à un projet de recherche au sein du laboratoire GRAP qui explorait le rôle de l'épigénétique dans les pertes de mémoire observées 48h après les deux épisodes de type *binge drinking*. Nos résultats obtenus dans ce contexte montrent que l'éthanol augmente de façon significative l'expression de l'histone déacétylase 2 (HDAC2) dans l'aire CA1 de l'hippocampe après 48h, une enzyme responsable de la modulation de l'état de compaction de la chromatine, et par extension impliquée dans la régulation de la transcription génique. De façon intéressante, prévenir cette augmentation de l'expression de HDAC2 par l'administration d'un inhibiteur HDAC, le butyrate de sodium (NaB), 30 minutes avant chaque épisode de *binge* prévient les effets de l'éthanol sur l'apprentissage et la DLT précédemment décrits après 48h. De plus, nos résultats indiquent que l'éthanol augmente de façon significative l'expression de la sous-unité GluN2B après 48h dans l'aire CA1 de l'hippocampe, un effet également prévenu par le NaB. Ces travaux font l'objet d'une publication que je signe en 2ème auteur (Drissi et al., 2020). Suite à la mise en évidence de modifications épigénétiques dans notre modèle de double *binge*, nous nous sommes demandé si l'épigénétique était le seul mécanisme impliqué dans les effets que l'on observait. En effet, des études montrent que l'éthanol est capable de déclencher une neuroinflammation en interagissant directement avec le récepteur TLR4 (Toll-like Receptor 4), un acteur bien connu de la neuroinflammation et d'ailleurs, prévenir cette neuroinflammation permet de conserver les performances mnésiques des animaux ayant une expérience prolongée de *binge drinking* pendant toute l'adolescence (Pascual et al., 2007). Pour vérifier cette hypothèse neuroinflammatoire de l'alcool, j'ai utilisé la minocycline, un antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices largement utilisé chez l'animal notamment dans les modèles d'expositions prolongées à l'éthanol ou dans des modèles de la maladie d'Alzheimer qui s'accompagnent également d'une neuroinflammation. Dans le but de prévenir les effets de l'éthanol, la minocycline a été administrée 30 minutes avant chaque injection d'éthanol, et comme précédemment, les effets ont été mesurés 48h après la première administration d'éthanol. Mes résultats indiquent que la minocycline prévient de façon significative l'abolition de la DLT et l'augmentation de la sensibilité du PPSE-NMDA à l'antagoniste de la sous-unité GluN2B. De plus, les effets de l'éthanol sur la mémoire dans un test de reconnaissance de nouvel objet sont aussi prévenus par la minocycline. En complément de l'étude de la DLT, l'étude de l'autre forme de plasticité synaptique, de type potentialisation à long terme (PLT) montre que les deux épisodes de *binge* augmentent l'amplitude de la PLT. De façon intéressante, cette

augmentation est également prévenue par l'administration préalable de minocycline. Mes résultats sont ainsi les seuls à démontrer la prévention des effets de l'étahnol sur la plasticité bidirectionnelle à l'aide d'un seul et même agent pharmacologique. Afin de confirmer l'implication d'une neuroinflammation dans notre modèle de double *binge*, j'ai également testé *in vivo* l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien, sur l'un des paramètres précédemment décrit, la DLT, et j'ai montré que cette substance prévient également l'abolition induite par l'éthanol après 48h. Finalement, j'ai ciblé, toujours *in vivo* le récepteur TLR4 en administrant du TAK-242, un antagoniste spécifique, 30 minutes avant chaque *binge*. Le TAK-242 prévient également de façon significative l'abolition de la DLT induite par l'éthanol. Au niveau cellulaire, nous avons mesuré par immunohistochimie le niveau d'expression du récepteur TLR4 dans l'aire CA1 de l'hippocampe 48h après les deux *binges* d'éthanol. Contrairement à ce que nous attendions et de manière intéressante, le marquage neuronal de TLR4 est significativement diminué 48h après l'éthanol et cet effet est significativement prévenu par la minocycline. La diminution de TLR4 neuronal, qui est un résultat innovant dans notre domaine d'étude, après l'éthanol a été confirmée au niveau protéïque par l'utilisation de la cytométrie en flux. L'expression du marquage de TLR4 dans les seuls neurones de CA1 montrait une diminution 48h après les deux *binges*. L'ensemble de ces résultats suggère que des processus de neuroinflammation sont déclenchés par les deux *binges* d'éthanol. Cependant, le résultat inattendu d'une baisse de l'expression de TLR4 au niveau des neurones, suggère que le pic inflammatoire survient bien avant 48h après les deux *binges,* d'autant plus que nous montrons une augmentation de la neurogénèse dans la zone sub-granulaire du gyrus denté 48h après les deux épisodes de type *binge drinking*, suggérant que des mécanismes de récupération ont été initiés. Des expériences supplémentaires sont donc à envisager dans le but de comprendre cette diminution de TLR4 et de confirmer le déclenchement précoce de processus neuroinflammatoires. Néanmoins, mes résultats démontrent que des inhibiteurs HDAC ou des anti-inflammatoires préviennent tous deux les effets cellulaires et comportementaux des deux épisodes de *binge* à l'adolescence. Finalement, moduler l'état de compaction de la chromatine ou bloquer/réduire la neuroinflammation chez les *binge drinkers* seraient des pistes thérapeutiques intéressantes dans l'atténuation des altérations mnésiques. Ainsi, en se basant sur notre démonstration de l'implication de ces deux mécanismes dans les effets des deux épisodes de *binge*, nous suggèrons que les effets mnésiques de l'éthanol sont déclenchés par une neuroinflammation transitoire qui induit une

modulation de l'épigénome responsable *in fine* des altérations de plasticité synaptique dans l'hippocampe et donc des déficits d'apprentissage que nous avons mesurés après 48h. Toutefois, confirmer cette succession d'évènements nécessite des expériences supplémentaires.

Dans ce manuscrit, nous présenterons dans un premier chapitre un bilan de la consommation d'éthanol dans la population française, les différentes modalités de consommation en se focalisant sur le phénomène de *binge drinking* et sur ses conséquences cérébrales. Dans un second chapitre, nous aborderons notre région cérébrale d'intérêt, l'hippocampe, et décrirons les phénomènes de plasticité synaptique à la base des processus mnésiques. Dans un troisième chapitre, nous nous intéresserons aux mécanismes épigénétiques, leurs rôles dans la cognition et l'impact de l'éthanol sur les processus d'acétylation des histones. Finalement, dans un dernier chapitre, nous aborderons la neuroinflammation, son rôle dans la mémoire et dans la plasticité synaptique, ainsi que son implication dans les effets de l'éthanol. Après avoir posé les questions scientifiques, nous aborderons la méthodologie puis les résultats sous forme d'articles scientifiques. Finalement, les résultats seront discutés et des perspectives seront proposées, avant de conclure.

INTRODUCTION

Chapitre I

Place de la consommation d'alcool dans notre société

En France, la consommation d'alcool, et notamment de vin, souligne un héritage social et culturel fort. Souvent associée à la fête et aux moments de convivialité, la consommation d'alcool en France est largement banalisée. En 2020, la quantité d'alcool mise en vente sur le territoire Français s'élevait à 10,38 litres d'alcool pur par habitant âgé de plus de 15 ans (Observatoire Français des drogues et des tendances addictives, OFDT). Dans notre pays, l'alcool est plutôt considéré comme un enjeu économique : en effet, la filière liée à la production et à la vente d'alcool en France représente 22 milliards d'euros de chiffre d'affaires, un montant important qui place le pays en seconde position sur le plan de la production mondiale, et en première position sur le plan de l'exportation. Parmi ces 22 milliards d'euros, 15 sont attribuables à la viticulture. La renommée du vin français n'est plus à faire, avec un panel de 3200 vins, produits dans 10 grands vignobles répartis sur 80 départements, soit plus de ¾ des départements métropolitains. Outre les chiffres associés à la production et à la vente, l'industrie de l'alcool représenterait près de 550 000 emplois directs ou indirects. Ainsi, il est aisé de considérer que la filière économique de l'alcool dans notre pays tient une place non négligeable dans le fonctionnement économique de notre société. Cependant, faut-il pour autant mettre de côté les conséquences graves que peut avoir la consommation d'alcool sur la santé et sur notre vie en société ? Rappelons qu'en France, l'alcool est la première cause d'hospitalisation (Paille and Reynaud 2015) et la seconde cause de mortalité évitable (cancers, cirrhoses, psychoses, dépendance alcoolique…), derrière la consommation de tabac (Andler et al. 2019). La consommation excessive d'alcool impacte lourdement la société dans son ensemble et bien au-delà de la sphère médicale, puisqu'elle est responsable de violences conjugales, d'accidents domestiques, d'accidents du travail, d'accidents de la route (30% de ces derniers seraient imputables à une consommation d'alcool), de précarisation et de nuisances au développement de l'enfant (Santé Publique France). Ainsi, en termes de coût social, l'ensemble des soins liés à la consommation d'alcool

représente 15 milliards d'euros par an (Ministère des Solidarités et de la Santé), un coût qu'il est intéressant de mettre en parallèle des bénéfices engendrés par le marché annuel de l'alcool. Sur ce constat, le maître mot reste, semble-t-il, d'informer la population vis-à-vis de sa consommation d'alcool et de ses conséquences. En effet, les recommandations concernant la consommation d'alcool ont évolué ces dernières années et depuis 2017, Santé Publique France et l'Institut National du Cancer ont mené un travail d'expertise scientifique et ne recommandent plus seulement une consommation maximale de deux verres standards d'alcool (1 verre standard = 10g d'alcool pur) par jour sans dépasser 10 verres par semaine, mais recommandent désormais d'introduire également des jours sans consommation d'alcool. Plus encore, l'expertise collective INSERM de 2021 sur la réduction des dommages associés à la consommation d'alcool conclue que « toute consommation pourrait comporter un risque pour la santé ». Les campagnes de prévention évoluent également : on ne sensibilise plus uniquement aux accidents de la route liés à l'alcool, mais aussi, actuellement en 2021, aux pathologies associées à la consommation d'alcool telles que les problèmes cardiovasculaires. D'ailleurs, la promotion de la santé et la prévention constituent le premier axe de la « Stratégie nationale de santé 2018 – 2022 » du Gouvernement actuel. Dans cet esprit, les associations françaises d'addictologie ont mis en place pour 2020 un événement destiné au grand public : le mois sans alcool, baptisé « le défi de Janvier », sur le modèle du « *Dry January* » mis en place depuis 2013 au Royaume-Uni et dont les résultats sont encourageants. Contre toute attente, en Novembre 2019, lors du mois sans tabac, le gouvernement français décide de ne pas s'associer à ce projet de mois sans alcool. Malgré cela, le « défi de Janvier » a eu lieu en 2020, pour la première fois en France, et a connu un succès non négligeable. Faire la différence entre patrimoine et impact sur la santé semble essentiel à l'heure actuelle. En effet, l'alcool tient toujours une place à part dans notre société et bien que les recommandations aillent dans le bon sens et aient diminué pratiquement par deux les repères de consommation, la prévention ne semble toujours pas à la hauteur des multiples dommages causés par la consommation d'alcool.

1- Les niveaux de consommation d'alcool en France

Malgré ce premier constat quelque peu négatif, il est bon de rappeler que la consommation d'alcool en France a sensiblement évolué depuis plusieurs années. En effet, la quantité d'alcool mise en vente est passée de 26 litres d'alcool pur en moyenne par habitant âgé de plus de 15 ans en 1961 à 10,38 litres en 2020, mais elle reste stable depuis pratiquement une décennie. Ce niveau de consommation, bien que diminué, reste néanmoins largement supérieur à la consommation mondiale moyenne annoncée par l'OMS qui s'élève à 6,2 litres d'alcool pur par habitant de plus de 15 ans en 2010. En 2017, 10% des Français entre 18 et 75 ans déclaraient consommer quotidiennement de l'alcool, et 24% dépassaient les seuils de consommation conseillés par Santé Publique France. Un verre standard en France contient 10g d'alcool (éthanol) pur, et correspond à une unité d'alcool. Un verre d'alcool servi dans un bar correspond à une unité d'alcool : un ballon de vin (10cl) à 12°, un verre de Whisky (2,5cl) à 40° ou encore 25cl de bière à 5°. Toutefois, un verre servi en dehors du cadre législatif, qui concerne les établissements autorisés à vendre de l'alcool, est en général plus généreux au regard de la quantité d'alcool pur par verre. En dehors de la consommation quotidienne d'alcool, les enquêtes mettent également en avant un mode d'alcoolisation rencontré particulièrement chez les jeunes adultes, nommé API pour Alcoolisation Ponctuelle Importante (au moins 6 verres en une occasion) dans les enquêtes réalisées en France par l'OFDT. En effet, en 2017, 16,2% des Français de 18 à 75 ans déclaraient avoir consommé au moins 6 verres en une occasion au cours du dernier mois (OFDT 2020). L'ensemble de ces chiffres indique que l'alcool est un acteur essentiel de la culture française, dont la consommation est banalisée et qui semble évoluer vers des pratiques de consommation plus intenses par occasion, notamment chez les jeunes. Ces niveaux de consommation d'alcool dans notre population devraient, de toute évidence, s'accompagner de conséquences mesurables, notamment en termes de santé publique.

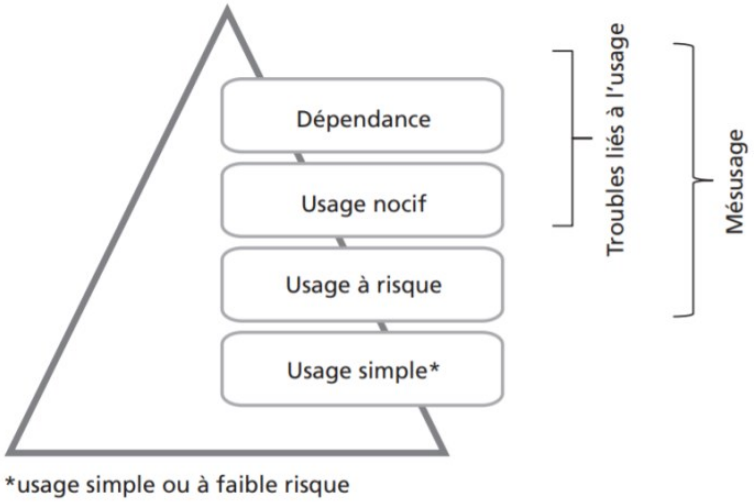
2- Consommation d'alcool : les conséquences

La consommation d'alcool en France est une cause importante de morbi-mortalité et d'incapacité, ce qui en fait un problème majeur de santé publique. En 2015, le nombre de décès liés à l'alcool était estimé à 41 000 personnes, dont plus de 70% d'hommes. Parmi ces décès, 16 000 concernaient des décès à la suite de cancers, 9 900 survenaient à la suite de maladies cardiovasculaires et 6 800 concernaient les maladies liées au système digestif telle que la maladie alcoolique du foie. Les accidents et suicides représentaient 5 400 décès et enfin, 3000 décès étaient dus à d'autres pathologies telles que l'épilepsie, le diabète de type II et les maladies mentales (Bonaldi and Hill 2019). De façon intéressante, cette étude montre également que la fraction de décès attribuable à l'alcool augmente en fonction de la consommation quotidienne d'alcool : par exemple, pour une consommation quotidienne de 35 à 53g d'alcool chez l'homme, la fraction attribuable est de 2,5% contre 33,8% pour une consommation quotidienne supérieure ou égale à 53g d'alcool. Une autre étude montre que la mortalité attribuable à la consommation d'alcool devient significative à partir de 100g d'alcool pur consommé par semaine (soit 10 verres standards ou 1,4 verre standard par jour de la semaine) et que cette mortalité augmente considérablement pour des doses d'alcool hebdomadaire plus élevées (Wood et al. 2018). Un tel constat facilite la compréhension des récentes évolutions des recommandations de Santé Publique France en termes de consommation d'alcool.

3- De l'usage contrôlé au trouble de l'usage de l'alcool

La consommation d'alcool se divise en plusieurs catégories (Figure 1) : « l'usage simple » désormais défini comme un « usage à moindre risque », qui correspond à une consommation dite « sociale » ; l'usage « à risque » où le consommateur se met en danger, par exemple dans le contexte de conduite automobile ; l'usage « nocif » caractérisé par l'apparition de

dommages somatiques, sociaux ou psychologiques, et enfin « la dépendance » comme dernière catégorie.



<u>Figure 1</u> : Pyramide d'évaluation de l'usage d'alcool.
Source : (Société Française d'Alcoologie 2015)

L'alcool (éthanol) est une molécule soluble dans l'eau et les lipides, diffusant facilement au travers des membranes cellulaires pour être rapidement absorbé dans le sang. L'éthanol est dégradé par le foie à l'aide d'une enzyme : l'alcool déshydrogénase (ADH) puis son métabolite l'acétaldéhyde est transformé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). La consommation d'alcool est responsable d'effets notables au niveau du système nerveux central (SNC). Sur le plan pharmacologique, l'éthanol est une substance psychoactive ayant des propriétés anxiolytiques, myorelaxantes, sédatives, analgésiques, hypnotiques et anesthésiques. A ce titre, l'alcool peut être considéré comme une drogue licite, et par conséquent une substance à risque de dépendance (Naassila 2018).

Considérée dans un premier temps comme une faiblesse d'esprit ou un vice, la dépendance à l'alcool est désormais reconnue comme une maladie psychiatrique à part entière. Les troubles de l'usage d'alcool sont notamment définis dans le manuel diagnostique des troubles mentaux (DSM). Depuis la dernière édition du DSM, le DSM-5, publié en 2013, on ne parle plus d'addiction à l'alcool mais de trouble de l'usage de l'alcool (TUA). Selon le DSM-5, le diagnostic du TUA repose sur la présence de 11 critères durant les 12 derniers mois (Table 1).

1	Perte de contrôle sur la quantité ou le temps dédié à la consommation
2	Désir ou efforts infructueux pour diminuer la consommation
3	Temps important passé à consommer/se procurer la substance ou se remettre des effets
4	Présence d'une envie irrépressible de consommer ou *craving*
5	Incapacité à remplir des obligations professionnelles ou familiales
6	Problèmes sociaux ou interpersonnels
7	Abandon des activités au profit d'une consommation d'alcool
8	Mise en danger physique du consommateur
9	Maintien de la consommation en dépit des conséquences négatives engendrées
10	Tolérance se manifestant par le besoin d'augmenter la dose d'alcool ou une diminution des effets de la substance ou une diminution des effets de la substance
11	Présence de signes de sevrage

Table 1 : Les 11 critères du DSM-5 pour le diagnostic du TUA.

Aujourd'hui, le diagnostic du TUA s'inscrit dans un continuum de sévérité : la validation d'au moins deux critères définit un niveau de sévérité faible, la présence d'au moins 4 critères correspond à une sévérité modérée et 6 critères ou plus, correspond à un TUA sévère (Aubin et al., 2013). L'introduction nouvelle de cette notion de degré de sévérité est censée permettre une meilleure prise en charge des patients dès les premiers signes de TUA et ainsi augmenter les chances de retour à un usage à moindre risque, un objectif que l'on appelle réduction des risques et des dommages (RdRD) en alcoologie. En effet, c'est l'interaction entre l'alcool et les circuits neuronaux qui participe à la transition de l'usage contrôlé vers la dépendance. Parmi les conséquences neurobiologiques d'une consommation à long terme d'alcool, le circuit cérébral de la récompense qui traduit la sensation de plaisir semble être particulièrement impacté. La communauté scientifique postule aujourd'hui que celui-ci serait excessivement activé par les expositions répétées à l'alcool, ce qui entrainerait une dérégulation du circuit de la récompense qui serait finalement de moins en moins sensible

aux effets récompensants de l'alcool. Cette dérégulation entrainerait une sensation de mal-être, compensée par l'augmentation des quantités d'alcool ingérées pour palier cette dysphorie et entrainant par conséquent un risque accru de dépendance (Koob 2014).

Pour autant, tous les consommateurs d'alcool ne deviennent pas dépendants au produit, ce qui suggère que nous ne sommes pas tous égaux face à la dépendance. Fort de cette constatation, le psychiatre Claude Olievenstein propose en 1983 un modèle bio-psycho-social des addictions. Ce modèle indique que le risque de transition vers un usage nocif ou une dépendance est associé à l'interaction entre les facteurs de risque liés au produit (dépendance, statut social du produit…), l'environnement (disponibilité du produit, influence des pairs, consommation familiale…), et l'individu (traits de caractère, événements de vie, patrimoine génétique…).

Dans ce contexte, des études ont montré que l'âge de début de consommation d'alcool influençait grandement la vulnérabilité à développer une dépendance à l'âge adulte. En effet, et à l'extrême, l'exposition *in utero* à l'alcool augmente significativement le risque de trouble lié à l'usage d'alcool à l'âge adulte (Alati et al. 2006). Suivant cette idée, les travaux de Hingson et collaborateurs en 2006 montrent que dans un échantillon d'individus alcoolodépendants, 47% avaient commencé à boire de l'alcool avant l'âge de 14 ans contre 9% à partir de 21 ans (Hingson et al. 2006). Une autre étude concernant des individus présentant un TUA montre également une corrélation significative entre l'âge de la première consommation et les quantités et fréquences de consommation d'alcool à un âge plus avancé. Ici, les sujets qui ont commencé à consommer de l'alcool avant 21 ans sont plus susceptibles de consommer fréquemment de grandes quantités d'alcool à l'âge adulte comparé à ceux qui ont commencé à consommer après 21 ans (Soundararajan et al. 2017). Dans le même ordre d'idée, des lycéens dont la première API (au moins 6 verres en une occasion) est survenue précocement au cours de l'adolescence sont plus susceptibles d'expérimenter les conséquences négatives liées à la consommation d'alcool dans les années qui suivent (Morean et al. 2018) et finalement, les individus ayant débuté une forte consommation d'alcool tôt à l'adolescence ont plus de risques de présenter des critères d'alcoolodépendance par la suite (Yuen et al. 2020). L'ensemble de ces résultats rapportés par la communauté scientifique devrait appeler à la prudence vis-à-vis de la consommation d'alcool chez les adolescents et les jeunes adultes.

4- Cas particulier de la consommation d'alcool chez les jeunes

Malgré une interdiction de vente aux moins de 18 ans en France (Code de la Santé Publique, art. L3342-1, L3342-3), l'alcool est la substance psychoactive la plus expérimentée chez les adolescents, devant le tabac et le cannabis. L'enquête EnCLASS 2018 (Enquête nationale en collège et en lycée chez les adolescents sur la santé et les substances, coordonnée par Emmanuelle Godeau et Stanislas Spilka), menée sur 20 000 collégiens et lycéens en France métropolitaine indique que près d'un élève de 6ème sur deux a déjà expérimenté l'alcool (44,3%), et qu'ils sont 75,3% en classe de 3ème. En revanche, les cas d'ivresse alcoolique diminuent significativement par rapport à une enquête précédente : 9,3% des collégiens étaient concernés en 2018, contre 13,4% en 2014. Au lycée, 85% des élèves ont déjà expérimenté les boissons alcoolisées, 62,1% des lycéens déclarent avoir eu un usage d'alcool dans le mois précédent l'enquête et 16,7% déclarent avoir un usage régulier d'alcool, c'est-à-dire au moins 10 usages dans le mois précédant l'enquête. Finalement, c'est lors de cette transition collège/lycée que les choses s'intensifient puisque 49,5% des lycéens ont déjà connu l'ivresse ; chiffre similaire à celui obtenu lors de l'enquête précédente en 2015. Parmi les effets de l'alcool, la recherche de l'ivresse semble être un but important chez les jeunes et le constat est clair : ils sont déjà 36,4% en classe de seconde à déclarer avoir eu une API au cours du mois précédant l'enquête et ce chiffre atteint 52,2% des élèves de classe de Terminale. Ce mode de consommation, qui consiste à absorber d'importantes quantités d'alcool en peu de temps afin d'atteindre l'ivresse, s'apparente à la notion plus générale d'intoxication éthylique aiguë, définie comme « *un état transitoire consécutif à la prise d'alcool, entraînant des perturbations physiologiques, psychologiques et comportementales. Il s'agit d'une ingestion, délibérée, aiguë, d'alcool éthylique dont la traduction clinique est l'ivresse* » (Menecier and Rotheval 2017). Dans les pays anglo-saxons, consommer de grandes quantités d'alcool en un temps très court renvoie au concept de *binge drinking*, particulièrement en vogue chez les adolescents et les jeunes adultes. *Le binge drinking* est un terme que s'est approprié aujourd'hui la communauté scientifique qui cherche à mieux comprendre les dimensions psychologiques, sociales et biologiques de ce comportement afin d'en prévenir les conséquences à long terme. Cependant, la traduction de cette expression anglo-saxonne en français reste difficile et seules les API y font référence même si des

différences entre les deux définitions peuvent apparaître. Avant d'entrer plus en détails dans notre sujet d'étude, il semble important de développer ce que représente le *binge drinking*.

5- Précisions sur le phénomène de *binge drinking*

Le *binge drinking*, terme anglo-saxon que l'on traduit communément en France par « biture express » renvoie donc à la notion de consommation excessive d'alcool en un temps très court. Il existe toutefois dans la littérature scientifique plusieurs définitions du *binge drinking* (Table 2), apportant un peu de confusion dans la compréhension du concept, comme précédemment rapporté par notre équipe de recherche, et menant à une forte hétérogénéité relative au choix de la définition du *binge drinking* entre les études (Rolland and Naassila 2017; Maurage et al. 2020). D'une part, L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le *binge drinking* comme la consommation d'au moins 60g d'alcool pur en une occasion (Desai 2010), ce qui équivaut en France à la définition d'une API. D'autre part, l'organisme Américain *US Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA) définit le *binge drinking* comme la consommation d'au moins 5 verres d'alcool en une occasion, au moins une fois au cours des 30 derniers jours (Hedden et al. 2015). Néanmoins, l'éthanolémie ne sera pas identique entre deux personnes du même sexe à consommation d'alcool égale mais à corpulence différente. Ainsi, l'organisme américain *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) introduit la notion d'éthanolémie et définit le *binge drinking* comme une modalité de consommation d'alcool qui conduit à une éthanolémie supérieure ou égale à 0,8g/L, généralement atteint par la consommation de 5 unités d'alcool en 2h pour un homme, et de 4 en 2h pour une femme. Le problème posé par une définition qui tente de regrouper le plus de consommateurs possibles afin que chacun, notamment les scientifiques, parle le même langage, est qu'elle est naturellement confrontée aux différences culturelles qu'implique la consommation d'alcool. Dans le cas présent, par exemple, il faut tenir compte de la définition d'un verre standard dans les différents pays. Aux USA, un verre standard contient 14g d'alcool pur, et donc 5 unités d'alcool correspondent à 70g d'alcool pur. La correspondance en France sera donc de 7 unités d'alcool puisque nos verres standards ne

contiennent que 10g d'alcool pur. Dans ce cadre, notons que la définition du *binge drinking* ne peut convenir à tous les pays puisqu'on doit se référer aux verres standards. Cependant, cette définition n'est pas destinée à des études scientifiques mais au grand public. Néanmoins, la définition du NIAAA a l'avantage de préciser le concept de *binge drinking* en intégrant à la fois la notion d'éthanolémie et la notion de temps. Toutefois, par rapport à la définition du SAMHSA, la notion de répétition n'est plus prise en compte. Finalement, le *binge drinking* pourrait se définir simplement par l'alternance répétée entre épisodes d'intoxication éthylique (éthanolémie > 0.8g/L) et période d'abstinence (Courtney and Polich 2009), et c'est ici que l'on voit apparaître une différence notable avec la définition de l'API. Dans le cadre de mes travaux nous nous sommes basés sur cette dernière définition du *binge drinking* associant quantité importante, rapidité d'exposition à l'alcool, et répétition de l'épisode d'alcoolisation massif

	BINGE DRINKING
OMS (Organisation Mondiale de la Santé)	60g d'alcool pur/occasion **= API**
SAMHSA (Substance Abuse and mental health Services Administration)	Au moins 70g d'alcool pur/occasion, au moins 1x/mois
NIAAA National Institue on Alcohol Abuse and Alcoholism)	♂ 70g en moins de 2h ♀ 56g en moins de 2h ⇒ Ethanolémie ≥ 0,8g/L

<u>Table 2</u> : Définitions du binge drinking en fonction des Organismes.

6- Alcoolisation chez les jeunes : les conséquences

Les conséquences d'une consommation d'alcool chez les adolescents et les jeunes adultes sont multiples. Une étude réalisée aux Etats-Unis entre 1998 et 2005 estime qu'au niveau national, le nombre de décès liés à l'alcool chez les étudiants de 18 à 24 ans s'élève à 1 825 par an, accidents de la route inclus. De plus, les blessures non intentionnelles sous influence de l'alcool concerneraient 599 000 étudiants, 646 000 seraient agressés physiquement par un autre étudiant alcoolisé, et 97 000 seraient victimes d'agressions sexuelles liées à l'alcool chaque année (Hingson et al. 2009). Plus récemment en 2017, les travaux de Bedendo et coll. rapportent que les étudiants qui s'adonnent au *binge drinking* (âge 18-30 ans, score moyen d'*Alcohol Use Disorders Identification Test* AUDIT : 7,3) sont plus susceptibles de présenter des problèmes académiques, d'agir de façon impulsive et d'avoir des remords, d'être impliqués dans des bagarres, de conduire en ayant bu ou encore d'accepter d'être transportés par une personne alcoolisée (Bedendo et al. 2017). Outre ces effets majoritairement comportementaux, des perturbations cognitives sont également rapportées : sur un ensemble d'étudiants issus de 128 universités de 33 états des Etats-Unis, 10% des non *binge drinkers*, 27,2% des *binge drinkers* occasionnels (1 à 2 épisodes de BD (≥ 5 verres/occasion) durant les deux dernières semaines) et 54% des *binge drinkers* fréquents (≥ 3 BD durant les deux dernières semaines) rapportent avoir oublié où ils étaient/ce qu'ils ont fait pendant un épisode d'alcoolisation (Wechsler et al. 2000). Dans cette étude, le mode de consommation d'alcool et la fréquence influencent l'apparition d'effets délétères chez les jeunes adultes. Les perturbations cognitives ayant lieu au moment de l'alcoolisation sont appelées *black-outs*, ou « trous noirs ». Il s'agit d'une période d'amnésie pendant laquelle l'individu s'engage activement dans un comportement alors même que son cerveau est incapable de créer une mémoire de cet événement (White 2003). Suivant la même idée, les étudiants considérés comme gros consommateurs d'alcool (inclusion basée sur la présence de critères de TUA ou ayant consommé de l'alcool plus d'une semaine sur deux durant les 6 derniers mois et dont au moins la moitié des épisodes de consommation s'apparente à du *binge drinking (*≥ 5 verres par occasion)) ont un score de réponses correctes moins élevé dans un test de mémoire prospective par rapport à ceux qui n'ont jamais consommé d'alcool (Zamroziewicz et al. 2017), et les hommes avec une consommation de type *binge drinking* (âge moyen 22 ans, BD ≥ 6

verres par occasion et ≥ à 2 occasions par mois) performent moins bien dans un test de mémoire visuelle immédiate (Vinader-Caerols et al. 2017). De plus, lorsque le recrutement est basé sur le questionnaire d'usage d'alcool *Alcohol Use Questionnaire* (AUQ), les sujets *binge drinkers* (score de *binge* ≥ 24) performent moins bien dans un test de mémoire de travail spatiale que les sujets non *binge drinkers* (score ⩽ 16) (Townshend and Duka 2005). D'autre part, des étudiants *binge drinkers* (âge 18-23ans, BD ≥ 6 verres en 2h), suivis et évalués pendant plusieurs années montrent des difficultés dans une tâche de mémoire verbale épisodique, reflétant probablement des difficultés dans l'encodage de la tâche, par rapport aux non *binge drinkers* (Carbia et al. 2017). Un effet similaire a été rapporté par notre équipe de recherche dans une population d'étudiants *binge drinkers* de l'Université de Reims Champagne-Ardenne : les *binge drinkers* (âge ≥ 18 ans , BD 56-70g d'éthanol en 2h, ≥ 1 épisode par mois durant les 6 derniers mois) consommant en moyenne 3 verres par heure et 17 verres par semaine présentent des performances réduites dans une tâche de mémoire verbale épisodique comparativement à des étudiants définis comme des buveurs sociaux (< 1 épisode de BD par mois) qui consomment 1,5 verre par heure et 5 verres par semaine. Une telle comparaison met en avant les effets plus délétères de la modalité de consommation de type *binge drinking* (Gierski et al. 2020). De plus, des adolescents/jeunes adultes entre 13 ans et 18 ans et suivis pendant 10 ans définis comme gros consommateurs d'alcool (53,2 verres par mois, durant les 3 derniers mois) présentent des perturbations de mémoire verbale, par rapport aux témoins (Hanson et al. 2011) et les travaux de Parada et collaborateurs, en 2011, montrent des déficits de mémoire déclarative chez des *binge drinkers* (âge 18-20 ans, BD ≥ 6 verres par occasion, ≥ 3 verres par heure, ≥ 1 fois par mois) par rapport aux non-*bingers* (Parada et al. 2011). Ce constat sur les atteintes cognitives liées à l'alcool chez les jeunes adultes a aussi été fait chez les adolescents : en effet, les travaux de Brown et coll. (2000) montrent que les adolescents de 15-16 ans qui présentent un TUA performent moins bien dans différents tests de mémoire verbale et non verbale (Brown et al. 2000). Toutefois, la diversité des critères utilisés pour définir la population de *binge drinkers* dans les études précédemment citées nous contraint à interpréter avec prudence les résultats obtenus.

Sur le plan neurobiologique, durant l'adolescence et le début de l'âge adulte, le cerveau connaît un remodelage intense : la myélinisation des axones qui renforce la communication cérébrale entraîne une augmentation du volume de la substance blanche et à l'inverse,

l'élimination des connexions inutiles, ou peu actives, entre neurones (élagage synaptique, ou *« pruning »*) se traduit par une diminution du volume de la substance grise (Giedd 2004). Cette période est souvent qualifiée de « fenêtre de vulnérabilité » pendant laquelle le cerveau va être particulièrement sensible à la toxicité de l'alcool (Spear 2018). Finalement, la maturation du cerveau humain, sur le plan de l'organisation des connexions inter-neuronales, ne s'achèverait que vers l'âge de 25 ans (Gogtay et al. 2004).

Outre les effets fonctionnels de la consommation d'alcool décrits précédemment, d'autres études ont rapporté des modifications structurales chez les jeunes. En effet, chez des adolescents entre 15 et 17 ans présentant un TUA, l'analyse par IRM montre une diminution du volume du cortex préfrontal et de la substance blanche chez les filles par rapport aux contrôles, et l'effet inverse chez les garçons (Medina et al. 2008). Concernant la substance blanche, les travaux de McQueeny et collaborateurs en 2009 montrent également que chez des adolescents de 16 à 19 ans, les faisceaux de substance blanche tel que ceux formant le corps calleux sont altérés chez les *binge drinkers* (consommation minimale de 4-5 verres en une occasion, au moins une fois durant les 3 derniers mois) par rapport aux contrôles (McQueeny et al. 2009). De façon similaire, chez des buveurs sociaux âgés de 18 à 25 ans qui s'adonnent au *binge drinking* (score de *binge* obtenu à partir de l'AUQ > 30), des atteintes fonctionnelles de la substance blanche associées à des déficits mnésiques notamment de la mémoire de travail spatiale ont été rapportés par notre équipe de recherche, comparativement aux non *binge drinkers* (score < 16) (Smith et al. 2017). Plus récemment et dans le contexte d'un épisode d'alcoolisation ponctuel, une étude américaine a montré une diminution du volume du corps calleux proportionnelle à l'éthanolémie atteinte (1 à 4g/L) immédiatement après la célébration du 21ème anniversaire. De façon intéressante, 5 semaines après cet épisode de *binge drinking* extrême, aucune récupération n'est observée (Hua et al. 2020). Le cervelet est également altéré : chez des adolescents de 16 à 19 ans, le niveau de *binge drinking* est associé à une réduction du volume du cervelet (Lisdahl et al. 2013). De façon intéressante, deux études révèlent une altération de l'hippocampe : chez des adolescents et jeunes adultes avec un TUA, le volume des hippocampes droit et gauche est réduit par rapport aux contrôles (De Bellis et al. 2000) et chez des adolescents de 15 à 17 ans présentant un TUA, l'analyse par IRM révèle un hippocampe gauche significativement plus petit comparé aux contrôles (Nagel et al. 2005).

Ainsi, l'ensemble de ces données souligne qu'une consommation d'alcool de type *binge drinking* entraîne des altérations fonctionnelles et structurales dans de nombreuses régions cérébrales incluant l'hippocampe. Définir les mécanismes impliqués dans ces effets est primordial pour la compréhension du mode d'action de l'éthanol sur les réseaux de neurones afin de mieux comprendre comment le *binge drinking* altère les fonctions cognitives.

Chapitre II

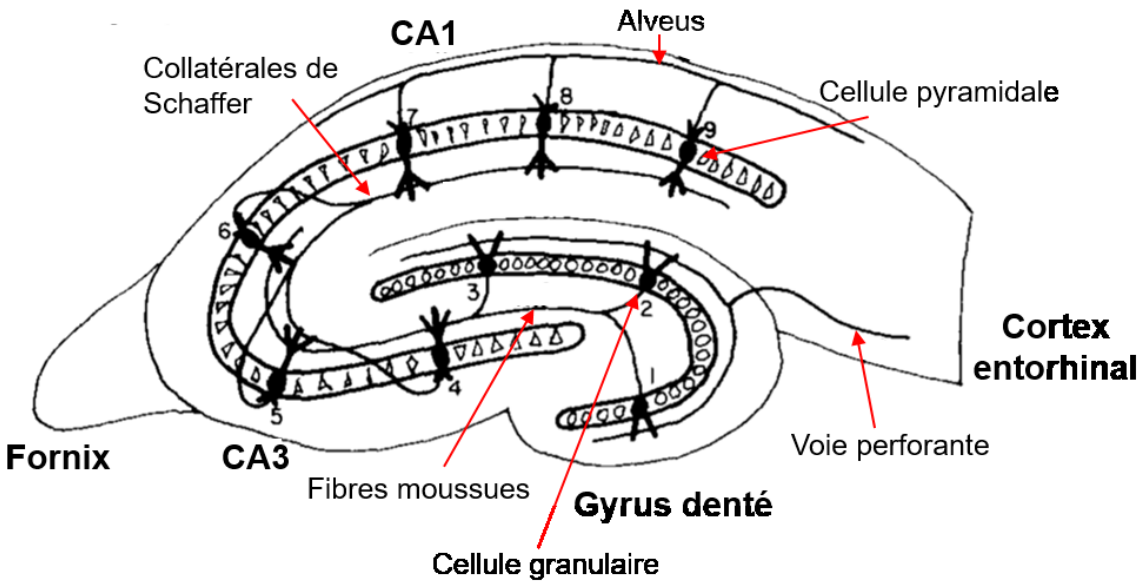
L'hippocampe

1- Rappels anatomiques

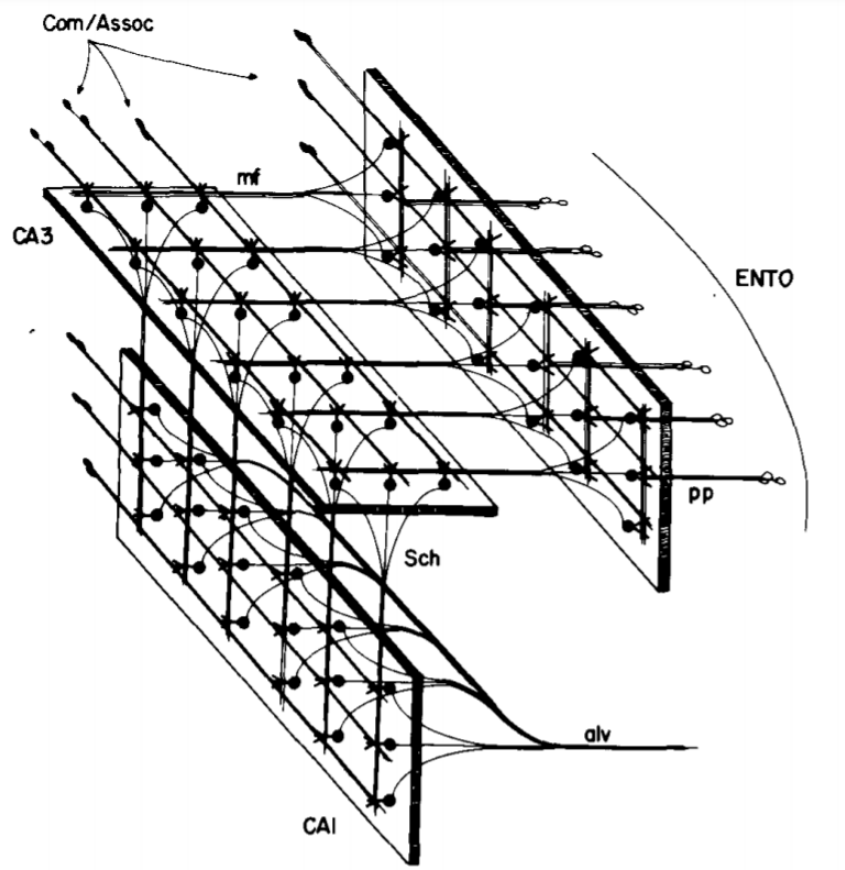
L'hippocampe est une structure cérébrale située dans le repli interne du lobe temporal. Il fait partie - avec le cortex entorhinal, le cortex cingulaire, l'hypothalamus, le noyau accumbens, l'amygdale, les noyaux septaux et le rhinencéphale - du système limbique qui est un ensemble de structures cérébrales interconnectées régulant principalement les processus mnésiques et émotionnels.

Anatomiquement, les hippocampes du rongeur et de l'humain sont orientés différemment au sein des encéphales : on distingue chez le rongeur un hippocampe dorsal et un hippocampe ventral alors que chez l'homme, l'hippocampe se subdivise en parties antérieure et postérieure. L'hippocampe dorsal s'apparenterait à l'hippocampe antérieur, et le ventral s'apparenterait à l'hippocampe postérieur (Colombo et al. 1998). Malgré cette différence dans l'orientation et les grandes parties structurales, l'hippocampe, tant chez l'Homme que chez le rongeur, est constitué de plusieurs régions : le gyrus denté (GD), la corne d'Ammon (CA) et le *subiculum* (Figure 2). Chaque région contient des cellules principales, de type granulaire dans le GD et pyramidales dans la CA et le *subiculum*, mais également des interneurones inhibiteurs, dont les dendrites sont entremêlées le long de ceux des cellules granulaires et pyramidales. Le GD se compose d'une couche simple de cellules granulaires dont les dendrites apicales sont orientées vers l'extérieur de cette région et reçoivent des projections depuis le cortex entorhinal ; projections qui forment la voie d'entrée des influx neuronaux nommée voie perforante. Le cortex entorhinal reçoit des projections depuis les néocortex temporal et frontal, mais également depuis l'amygdale, l'aire tegmentale ventrale, le noyau du raphé et le locus coeruleus. La corne d'Ammon, quant à elle, se subdivise en 4 aires ou champs : CA1, CA2, CA3 et CA4. Les aires CA2 et CA4 sont rarement représentées sur

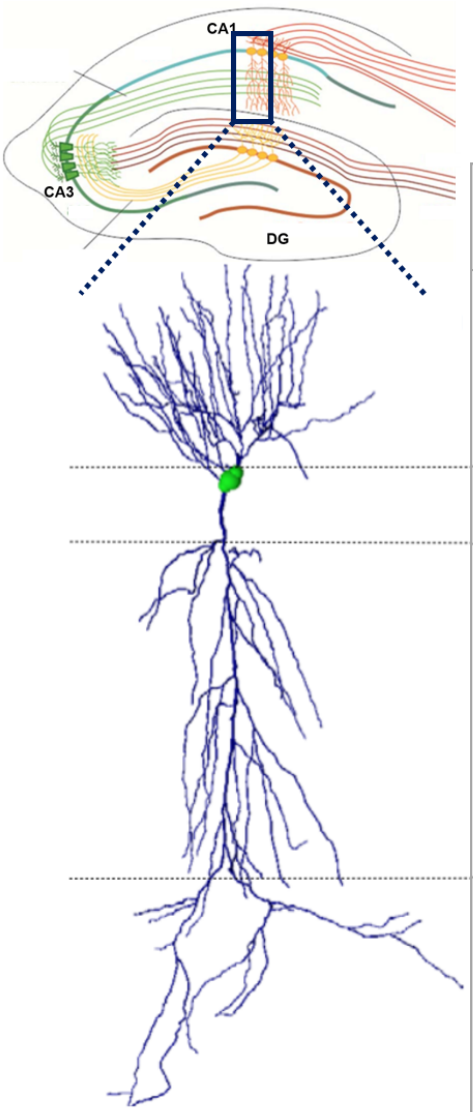
les schémas car elles sont très petites. De plus, elles ne sont que peu étudiées. Les axones des cellules granulaires, qui forment la voie des fibres moussues, projettent vers les dendrites de CA3. A leur tour, les cellules pyramidales de CA3 projettent d'une part et principalement vers l'hypothalamus, le noyau accumbens, le tronc cérébral, la formation réticulée via le fornix, par le biais des fibres commissurales, et d'autre part vers les dendrites du champ CA1 via les collatérales de Schaffer. Les axones des cellules pyramidales de CA1 projettent ensuite vers le *subiculum* puis vers le cortex entorhinal, et atteindront finalement les différentes aires corticales associatives. Ainsi, l'architecture de l'hippocampe se définie comme un circuit trisynaptique (Figure 3) et chaque aire de la corne d'Ammon possède 5 couches (Figure 4) (Teyler and DiScenna 1984; Strange et al. 2014; Pinar et al. 2017).



<u>Figure 2</u> : Coupe frontale d'un hippocampe de rongeur.
CA : Corne d'Ammon
Adapté de Teyler and DiScenna, 1984



<u>Figure 3 :</u> Représentation du circuit trisynaptique de l'hippocampe. Com/Assoc : Commissurales/Associatives ; mf : fibres moussues ; Sch : collatérales de Schaffer ; pp : voie perforante ; ENTO : entorhinal ; alv : alveus.
Issu des travaux de Teyler and DiScenna, 1984



Alveus	Contient les axones des cellules pyramidales
Stratum oriens	Contient les dendrites basales des cellules pyramidales, les interneurones inhibiteurs, les afférences du septum et du fornix
Stratum pyramidale	Contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux
Stratum radiatum	Contient les dendrites apicales proximales des neurones pyramidaux, les interneurones inhibiteurs, les afférences du septum, du fornix, les collatérales de Schaffer et les fibres commissurales
Stratum moleculare/lacunosum	Contient les arborisations des dendrites apicales des cellules pyramidales et les fibres de la voie perforante

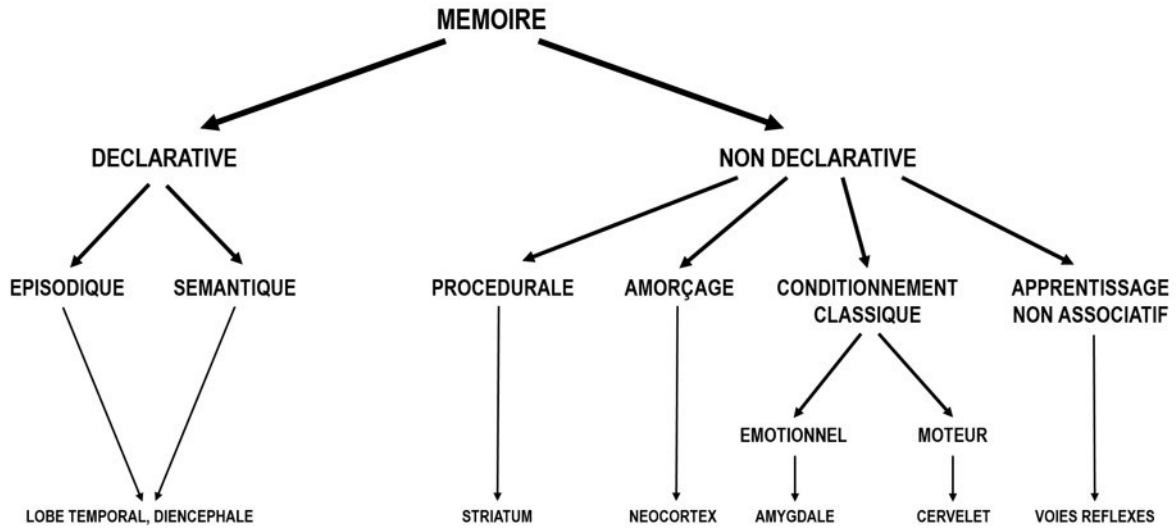
<u>Figure 4</u> : Représentation d'un neurone pyramidal dans différentes couches des régions CA3/CA1 de l'hippocampe.
Illustration adaptée de (Batmunkh et al. 2018)

2- Implication de l'hippocampe dans les processus physiologiques d'apprentissage et de mémoire

La mémoire est un apprentissage qui persiste dans le temps, traduisant notre capacité à stocker et à rappeler des informations. L'ensemble du processus de mémorisation chez l'Homme est séquentiel et est constitué de 3 phases : l'encodage, la consolidation et la récupération (Atkinson and Shiffrin 1968). L'encodage concerne la capacité à acquérir de nouvelles informations en provenance de nos organes sensoriels. Lorsque l'information reçue est pertinente, celle-ci passe dans la mémoire à court terme (MCT), c'est l'encodage. La MCT permet le maintien voire l'utilisation/manipulation immédiate de l'information. Avec la MCT, il a été introduit le concept de mémoire de travail, décrit comme le système permettant la rétention temporaire et la manipulation des informations nécessaires à la réalisation d'activités telles que la compréhension, l'apprentissage ou le raisonnement (Baddeley 2010). L'étape suivante du processus de mémorisation est la consolidation de l'information. Cette étape correspond à une période de répétition inconsciente qui a lieu jusqu'à ce que l'information soit ancrée et traduit le passage de l'information dans la mémoire à long terme (MLT). Finalement, la dernière étape du processus consiste à rappeler l'information depuis la MLT pour l'utiliser en MCT, c'est la récupération. En effet, être incapable de restituer une information stockée en mémoire à long terme traduit un échec dans le processus de mémorisation.

La MLT évoquée ci-dessus correspond au stockage quasiment illimité de l'information. Lary Squire a proposé, en 1992, une classification des différentes mémoires à long terme (Squire 1992) (Figure 5), sur la base d'observations menées chez l'Homme et chez l'animal et qui est toujours utilisée à ce jour. Selon cette classification, la mémoire se subdivise en deux systèmes : la mémoire déclarative, c'est-à-dire verbalisable ou explicite, et la mémoire non déclarative ou implicite. Ces deux systèmes sont eux-mêmes sous divisés en plusieurs formes de mémoires à long terme, qui reposent sur des structures cérébrales bien distinctes. Ainsi, la mémoire déclarative se divise en deux formes: la mémoire épisodique qui correspond à la mémoire autobiographique, basée sur les évènements vécus, et la mémoire sémantique qui se réfère aux savoirs et connaissances générales qui sont à la fois personnelles et publiques. Ces deux types de mémoires engagent le lobe temporal et le diencéphale. La mémoire non

déclarative renvoie à tous les apprentissages inconscients qui incluent les habilités motrices (les savoir-faire tels que le vélo et la lecture) qui font intervenir les noyaux de la base et notamment le striatum ; les habiletés cognitives avec le principe d'amorçage qui renvoie aux modifications qui interviennent en réponse à un stimulus déjà rencontré et qui fait intervenir le néocortex ; le conditionnement classique qui correspond à l'association entre un stimulus et une réponse émotionnelle ou motrice faisant intervenir l'amygdale et le cervelet, et finalement l'apprentissage non-associatif qui fait intervenir des voies réflexes. Ici, le lobe temporal est notamment impliqué dans le système de mémoire déclarative, et nous allons définir plus en détail le rôle de l'hippocampe dans les processus mnésiques qui lui sont associés.



<u>Figure 5 :</u> Taxonomie des systèmes de mémoires à long terme chez le mammifère et les structures cérébrales associées.
Adapté de (Squire 2004)

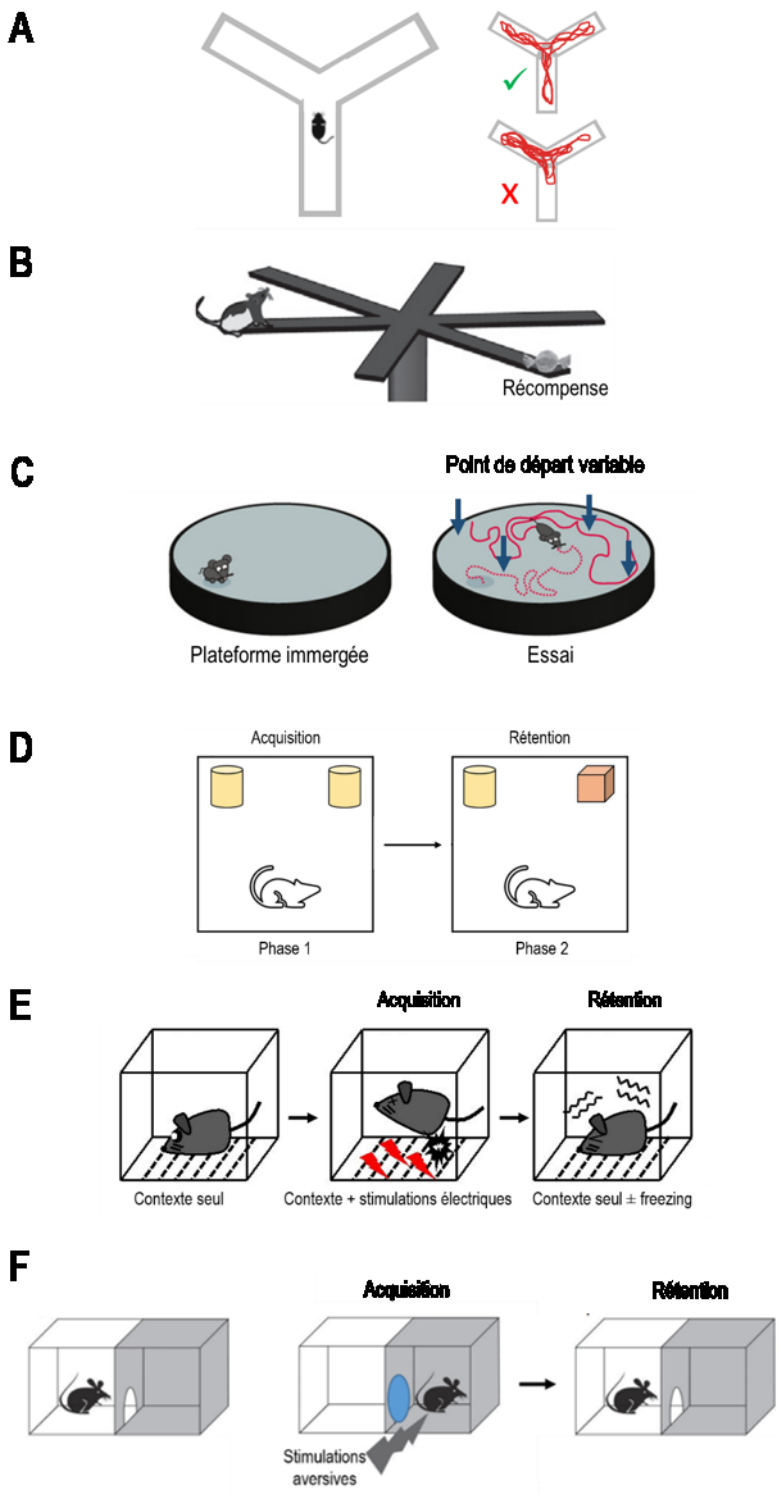
L'implication de l'hippocampe dans les fonctions mnésiques a été mise en évidence grâce au cas clinique H.M. (Henry Molaison, 1926-2008), qui présentait une amnésie rétrograde modérée et antérograde massive suite à la résection bilatérale des deux lobes temporaux médians (Scoville and Milner 1957), incluant l'hippocampe. Le patient a, par la suite, participé à plusieurs études qui ont permis d'identifier le rôle clé du lobe temporal médian dans un large panel de fonctions mnésiques telles que la reconnaissance de mots ou images précédemment présentés ainsi que le rappel libre de mots et de la position d'objets

(Milner et al. 1968). Plus tard, ces observations ont été retrouvées chez des patients dont les dommages étaient limités à l'hippocampe (Zola-Morgan et al. 1986; Rempel-Clower et al. 1996) et l'émergence de l'imagerie fonctionnelle a confirmé l'implication de l'hippocampe dans l'encodage des informations verbales et visuelles (Squire et al. 1992; Nyberg et al. 1996; Stern et al. 1996). A l'inverse des études chez l'Homme, l'étude de la mémoire chez l'animal pose une limite évidente : la verbalisation. De fait, Clayton et coll. (2003) ont développé des critères comportementaux pour étudier la mémoire épisodique chez l'animal qui se basent sur la définition émise par Endel Tulving en 1972 : ce qu'il s'est passé (quoi, *what*), où cela s'est-il passé (où, *where*) et quand cela s'est-il passé (quand, *when*) (Tulving 1972; Clayton et al. 2003). Lorsque le test comportemental utilisé chez l'animal ne vérifie pas ces 3 critères, il est délicat de distinguer entre mémoire épisodique et mémoire sémantique. Ainsi, chez l'animal, on parlera généralement de mémoire déclarative sans distinguer le sous-type.

La littérature scientifique chez l'animal apporte des connaissances solides quant à l'implication de l'hippocampe dans différentes tâches mnésiques (schématisées Figure 6). En effet, l'hippocampe est impliqué dans la mémoire de travail et celle-ci peut être évaluée par le test d'alternance spontanée. Il s'agit d'un dispositif en « Y » ou en « T » dans lequel l'animal est placé pendant quelques minutes et qu'il peut explorer librement. Ce test est basé sur le caractère exploratoire spontané du rongeur et lorsqu'il dispose d'une mémoire de travail performante, il aura tendance à explorer le bras du dispositif qu'il n'a pas visité à l'essai précédent. Il s'agit d'une tâche hippocampo-dépendante puisque l'alternance spontanée est perturbée chez des rats dont l'hippocampe est lésé (Stevens and Cowey 1973). Outre la mémoire de travail, l'hippocampe est également impliqué dans la mémoire à long terme de type déclarative. En effet, l'hippocampe est largement impliqué dans la navigation spatiale grâce à la présence de cellules spécifiques appelées « cellules de lieu », des cellules qui déchargent lorsque le sujet est à un endroit précis de l'environnement, et nulle part ailleurs (O'Keefe and Conway 1978). L'implication de l'hippocampe dans la navigation spatiale a été démontrée chez le rongeur dans plusieurs tests et notamment le labyrinthe à 8 bras, où une lésion de l'hippocampe perturbe l'efficacité de la collecte de nourriture dans les différents bras du dispositif (Olton et al. 1978). Suivant la même idée, à l'aide du test de la piscine de Morris dans lequel l'animal doit retrouver une plateforme immergée, une lésion de l'hippocampe entraîne une perturbation de la mémoire spatiale dès lors que le point de départ

est variable (Eichenbaum et al. 1990) donc dès lors que l'activation des « cellules de lieu » est nécessaire. D'ailleurs, chez l'humain, l'hippocampe droit est activé en imagerie fonctionnelle lorsque l'on demande à un individu de se souvenir d'un trajet dans un endroit familier (Maguire et al. 1998), confirmant l'implication de l'hippocampe dans la navigation spatiale à la fois chez l'homme et chez le rongeur. Outre la mémoire spatiale, l'hippocampe est aussi impliqué dans la mémoire de reconnaissance. Clark et collaborateurs, en 2000, ont montré qu'une lésion de l'hippocampe perturbait la mémoire des rats dans un test de reconnaissance de nouvel objet (Clark et al. 2000). En bref, ce test consiste en deux phases : la phase d'apprentissage, où les animaux explorent deux objets inconnus, et une phase de reconnaissance qui intervient à différents délais après la première phase, et au cours de laquelle on remplace un des deux objets précédemment rencontrés par un nouvel objet en mesurant le temps que passe l'animal sur ce nouvel objet. Ce test est basé sur le caractère exploratoire spontané de l'animal et s'il a bien mémorisé les deux objets rencontrés lors de la phase 1, il passera plus de temps à explorer le nouvel objet lors de la phase 2. L'implication de l'hippocampe dans ce test a été confirmé par d'autres travaux (Ainge et al. 2006) et plus récemment, des travaux ont montré que l'inactivation de l'hippocampe dorsal chez le rat suffisait à perturber la mémoire de reconnaissance (Cohen et al. 2013). Par ailleurs, l'apprentissage d'une réponse de peur conditionnée peut, dans certains cas, impliquer l'hippocampe. La peur conditionnée repose sur le principe du conditionnement classique où l'on associe un stimulus neutre à un stimulus inconditionnel, directement associé à une réponse émotionnelle ou musculaire. L'individu va associer le stimulus neutre au stimulus inconditionnel et *in fine*, la présentation du stimulus neutre seul (que l'on appellera, dès lors, stimulus conditionné) induira la réponse conditionnée. La réponse conditionnée de peur sera évaluée en mesurant le pourcentage de temps passé en position immobile ou *freezing*. De façon intéressante, lorsque le stimulus neutre est un indice (son, lumière…), une inactivation pharmacologique de l'hippocampe n'a aucun impact sur la rétention de la tâche. En revanche, lorsque le stimulus neutre est un contexte (une enceinte avec des murs rayés…), l'inactivation de l'hippocampe perturbe la mémoire de peur apprise, montrant ainsi que l'hippocampe est crucial pour la mémoire de peur conditionnée liée au contexte (Kim and Fanselow 1992). Cet effet est confirmé par Phillips et Ledoux, en 1992 qui montrent qu'une lésion de l'hippocampe perturbe l'apprentissage de peur conditionnée liée au contexte et de plus, ils montrent qu'une lésion de l'amygdale perturbe l'apprentissage de peur conditionnée liée à un indice (Phillips

and LeDoux 1992). Finalement, Lorenzini et coll. (1996) ont tenté de déterminer la structure cérébrale impliquée dans l'évitement passif. Lors de ce test, l'animal est placé dans une enceinte à deux compartiments (éclairé et sombre) où le passage d'un compartiment à l'autre est contrôlable. Les animaux, des rongeurs en général, déposés dans le compartiment éclairé, se dirigent naturellement vers le compartiment sombre. Une fois dans ce compartiment, la porte est fermée et l'animal reçoit des stimulations aversives puis retourne dans le compartiment éclairé. Un certain laps de temps plus tard, l'animal est remis dans le compartiment éclairé et on mesure le temps que met l'animal à aller dans le compartiment sombre. Dans ce contexte, les auteurs montrent que l'inactivation de l'hippocampe dorsal ou de l'hippocampe ventral des rats pertube l'acquisition et la rétention de la réponse d'évitement passif(Lorenzini et al. 1996; Ambrogi Lorenzini et al. 1997).



<u>Figure 6</u> : Présentation schématique des différents tests de mémoire hippocampo-dépendante chez le rongeur. A : Alternance spontanée, adapté de (Kraeuter et al. 2019) ; B : Labyrinthe à 8 bras, adapté de (Schlesiger et al. 2013) ; C : Piscine de Morris, adapté de (Galliano et al. 2013) ; D : Test de reconnaissance de nouvel objet, adapté de (Barker et al. 2017) ; E : Peur conditionnée liée au contexte, adapté de (Shin 2012) ; F : Evitement passif, adapté de (Branchi and Ricceri 2013).

Ainsi, l'ensemble de ces études indique un rôle prépondérant de l'hippocampe dans les processus mnésiques chez le rongeur qui corrobore les observations recueillies chez l'Homme. Les différents apprentissages et les différents types de mémorisation reposent sur des mécanismes cellulaires que nous allons détailler dans la partie suivante.

3- Mémoire et apprentissage à l'échelle du neurone : transmission et plasticité synaptique

Le SNC est majoritairement constitué de neurones et de cellules gliales. Le neurone est une cellule excitable dont le potentiel membranaire de repos est situé aux alentours de -70mV. La transmission de l'information au sein du le neurone est unidirectionnel et se propage des dendrites vers l'axone. Le neuroscientifique espagnol Santiago Ramòn y Cajal (1853-1934) a été le premier à mettre en évidence que les neurones n'étaient pas physiquement liés entre eux, ce qui lui a valu le Prix Nobel de médecine en 1906. En effet, les communications interneuronales ont lieu par l'intermédiaire de « synapses », décrites par Charles Scott Sherrington. Il existe deux types de synapses : la synapse électrique dans laquelle la transmission du signal se fait de façon directe par des jonctions communicantes, et la synapse chimique dans laquelle la transmission du signal se fait de façon indirecte, par le biais d'une libération de neurotransmetteur dans un esapce inetercellulaire, la fente synaptique. Le neurotransmetteur est stocké dans le neurone présynaptique dans des vésicules et libérés dans la fente synaptique par exocytose. Une fois libérées, les molécules de neurotransmetteur se fixent sur les récepteurs situés généralement sur le neurone post-synaptique, mais ils peuvent également se fixer sur des récepteurs présents sur la membrane pré-synaptique. Finalement, le neurotransmetteur est capturé par les neurones ou les cellules gliales avoisinantes, ou dégradé. Parmi les neurotransmetteurs, on retrouve le glutamate qui est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC, et l'acide γ-aminobutyrique (GABA) qui représente le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC.

a) Les récepteurs impliqués dans la transmission synaptique

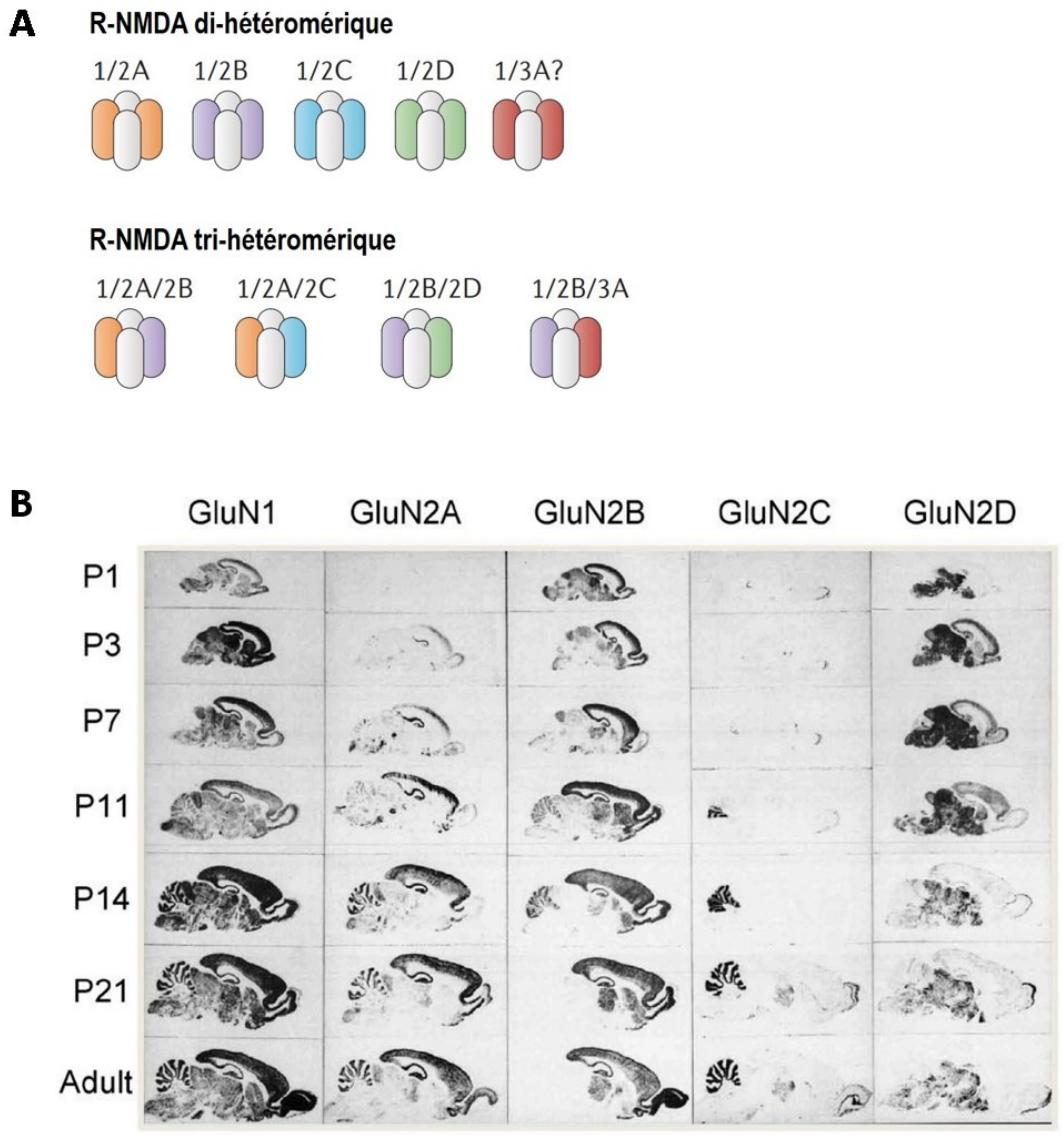
Lorsque le neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique, il se fixe sur des récepteurs qui présentent une spécificité pour le neurotransmetteur en question. Cette fixation va permettre un influx d'ions qui va générer une variation du potentiel de membrane : on parlera de potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) ou inhibiteur (PPSI) en fonction de la nature déporlisante ou hyperpolarisante du signal électrique déclenchée dans le neurone postsynaptique. Ces récepteurs sont soit ionotropiques, soit métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs perméables aux ions (récepteur canal) qui, lors de la fixation de leur ligand, vont changer de conformation. Ainsi, dans leur conformation ouverte, ils laissent passer des ions spécifiques qui vont modifier le potentiel de membrane du neurone post-synaptique. Les récepteurs métabotropiques agissent quant à eux par l'intermédiaire d'une activation de protéines transductrices : les protéines G, qui vont activer des cascades de signalisation intracellulaire et peuvent, *in fine*, moduler de façon indirecte des canaux ioniques. Comme mentionné précédemment, le glutamate et le GABA sont les deux neurotransmetteurs les plus présents au sein du SNC. Nous présenterons dans la suite du document le glutamate qui possède des récepteurs ionotropiques (kainate, NMDA, AMPA) et métabotropiques (mGluR1 à 8), puis les récepteurs au GABA.

Les récepteurs du glutamate

Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont formés de 4 sous-unités dont chacune comprend un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine de liaison au ligand, un domaine transmembranaire formant le canal et un domaine intracellulaire C-terminal (Traynelis et al. 2010). Les récepteurs AMPA se composent de 4 sous-unités : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4. Chacune des sous-unités possède un site de fixation au glutamate. Le récepteur AMPA est perméable aux ions Na^+ et K^+ et éventuellement au Ca^{2+}. En effet, l'absence de la sous-unité GluA2 rend le récepteur perméable à ces ions, alors que sa présence dans la structure du récepteur AMPA rend le récepteur imperméable au Ca^{2+} (Goodwani et al. 2017). Les récepteurs AMPA sont essentiellement localisés dans la membrane du neurone post-synaptique (Wisden and Seeburg 1993). Les récepteurs Kaïnate, quant à eux, sont des

combinaisons tétramériques de 5 sous-unités : GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2. Les sous-unités GluR peuvent former des homomères ou hétéromères fonctionnels, alors que les sous-unités KA1 et KA2 doivent s'apparenter à des GluR pour former un récepteur fonctionnel (Lerma 2006). Les récepteurs Kaïnate sont perméables aux ions Na^+ et K^+ et sont situés à la fois en pré-synaptique et en post-synaptique, ils semblent réguler la libération de glutamate et de GABA dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Chittajallu et al. 1996; Clarke et al. 1997). Finalement, les récepteurs NMDA sont assemblés en hétéromères qui diffèrent par leur composition en sous-unités. Sept sous-unités ont été identifiées à ce jour : GluN1, GluN2A à D et GluN3A et B. Généralement, le récepteur NMDA s'assemble en tétramères composés de sous-unités 2*GluN1+2*GluN2 ou 2*GluN1+GluN2+GluN3 (Figure 7A). La sous-unité GluN1 porte le site de fixation des deux co-agonistes du récepteur NMDA : la glycine et la D-serine alors que la sous-unité GluN2 porte les sites de fixation du glutamate et du zinc (Zn^{2+}). La sous-unité GluN3, bien que moins caractérisée, semble également porter un site de fixation pour la glycine et la D-serine. Les sous-unités GluN1, GluN2 et GluN3 diffèrent les unes des autres par leur domaine intracellulaire C-terminal dont la longueur varie. Cette variation va influencer le trafic des récepteurs NMDA au sein de la synapse ainsi que leur interaction avec les cascades de signalisation intracellulaires. De manière intéressante, la maturation cérébrale s'accompagne d'une évolution de la composition en sous-unités du récepteur NMDA, puisque la sous-unité GluN2A, peu exprimée à la naissance, est très présente dans l'ensemble du système nerveux central à l'âge adulte alors que la sous-unité GluN2B est extrêmement présente à la naissance et son expression décroît au fil du développement jusqu'à un niveau faible à l'âge adulte en étant principalement localisé dans le prosencéphale. L'expression de la sous-unité GluN2C, quant à elle, augmente graduellement de la naissance à l'âge adulte et elle est localisée principalement dans le bulbe rachidien et le cervelet, alors que la sous-unité GluN2D est très exprimée à la naissance et diminue fortement au cours du développement, et n'est présente à l'âge adulte que dans le mésencéphale (Akazawa et al. 1994) (Figure 7B). Finalement dans l'hippocampe, ce sont les sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B qui sont les plus présentes. De façon intéressante, la composition en sous-unités GluN2A et/ou GluN2B du récepteur NMDA va modifier ses propriétés electrophysiologiques et notamment sa conductance calcique. Le récepteur NMDA, majoritairement localisé au niveau post-synaptique, est un canal voltage-dépendant perméable aux ions Ca^{2+} et dans une moindre mesure aux ions Na^+ et K^+. Aux valeurs proches du potentiel de repos, le récepteur NMDA est

bloqué par des ions Mg^{2+} ambiants empêchant ainsi tout flux d'ion. Ce blocage par le Mg^{2+} intervient de façon voltage-dépendante, et seule une dépolarisation conséquente du neurone permet son évacuation. Les récepteurs NMDA di-hétéromères composés des sous-unités GluN1/GluN2A ont une probabilité d'ouverture supérieure aux di-hétéromères composés des sous-unités GluN1/GluN2B mais le temps d'inactivation du canal GluN1/GluN2B est plus long que celui du canal GluN1/GluN2A. Ainsi, suite à une libération de glutamate dans la fente synaptique, l'influx de Ca^{2+} sera plus important pour les récepteurs NMDA composés de la sous-unité GluN2B, comparativement à ceux composés de la sous-unité GluN2A (Vicini et al. 1998; Gonda 2012; Paoletti et al. 2013). On peut moduler pharmacologiquement le fonctionnement du récepteur NMDA à l'aide d'outils pharmacologiques spécifiques. En effet, il existe des agonistes et antagonistes compétitifs qui se fixent sur le site glycine ou D-sérine de la sous-unité GluN1 ou sur le site du glutamate de la sous-unité GluN2. Il existe également des modulateurs allostériques positifs ou négatifs qui se fixent sur le domaine extracellulaire N-terminal de la sous-unité GluN2. Finalement, certaines molécules se fixent dans le pore du canal. La Table 3 rassemble des exemples de molécules modulant le fonctionnement du récepteur NMDA.



<u>Figure 7</u> : Le récepteur NMDA : association des sous-unités et profil d'expression.
A) Les différentes associations de sous-unités formant le récepteur NMDA. B) Profil d'expression des différentes sous-unités du récepteur NMDA sur des sections parasagittales de cerveau de rat depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte.
Adapté de (Paoletti et al. 2013; Hansen et al. 2018).

	COMPETITIF		NON COMPETITIF	MODULATEUR ALLOSTERIQUE	
	Agoniste	**Antagoniste**	**Antagoniste**	**Positif**	**Négatif**
GluN1	Glycine D-alanine D-sérine	Acide kynurénique		Polyamines (spermine, spermidine)	
GluN2	Glutamate NMDA ACPD (1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid) ACBP (1-aminocyclobutane-1,3-dicarboxylic acid)	D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid) R-CPP (3-((R)-2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid) NVP-AAM077 (GluN2A)			Zn2+ (GluN2A > GluN2B) Ifenprodil (GluN2B > GluN2A) Ro 25-6981 (GluN2B)
Pore			Kétamine Phencyclidine MK-801 Mémantine		

Table 3 : Pharmacologie du récepteur NMDA, selon (Gonda 2012).

Les récepteurs métabotropiques (mGluR) au glutamate sont des membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont des protéines ancrées à la membrane dont l'activation se fait par des ligands extracellulaires, entrainant une activation de voies de signalisation intracellulaires par l'intermédiaire de leur interaction avec des protéines transductrices, les protéines G. Les mGluR sont classés en 3 groupes : les mGluR1 et 5 font partie du groupe I, les mGluR2 et 3 font partie du groupe II, et les mGluR4, 6, 7 et 8 font partie du groupe III. Les mGluR du groupe I sont généralement localisés sur l'élément post-synaptique et sont associés à la voie de la phospholipase C, induisant une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et ainsi l'excitabilité du neurone. Les mGluR des groupes II et III sont plus souvent retrouvés sur l'élément pré-synaptique, où ils inhibent la voie de l'adénylate cyclase, entraînant une diminution du Ca^{2+} intracellulaire

inhibant ainsi la libération de neurotransmetteurs (Niswender and Conn 2010; Mukherjee and Manahan-Vaughan 2013).

Les récepteurs du GABA

L'acide gamma-amino-butyrique (GABA) est communément défini comme étant le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Il s'associe aux récepteurs $GABA_A$ et $GABA_C$ qui sont ionotropiques ou $GABA_B$ qui sont métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques de type $GABA_A$ sont des hétéropentamères constitués de différentes sous-unités : α1 à 6, β1 à 3, γ1 à 3, δ, θ, π et ρ1 à 3. La composition en sous-unités module la conductance et l'affinité du récepteur pour son ligand endogène. Les récepteurs $GABA_A$ composés des sous-unités α1 et γ2 sont généralement situés au niveau synaptique et impliqués dans l'inhibition phasique alors que les récepteurs composés des sous-unités α4, α5, α6 et δ sont majoritairement retrouvés au niveau péri/extrasynaptique et impliqués dans l'inhibition tonique. Ce sont des récepteurs ligand-dépendants perméables aux ions Cl^-. Les récepteurs $GABA_c$ sont quant à eux ~~sont~~ des homopentamères composés uniquement des sous-unités ρ1 à 3, majoritairement retrouvés au niveau de la rétine. Finalement, les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ sont composés de deux sous-unités : $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$. Ils sont présents à la fois sur les versants pré- et postsynaptique et la fixation du GABA sur ces récepteurs active des cascades de signalisation intracellulaire qui *in fine* activent des canaux K^+ postsynaptiques conduisant à une lente hyperpolarisation et donc à une diminution de l'excitabilité neuronale, ou inhibent les canaux Ca^{2+} présynaptiques, diminuant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Dans l'hippocampe, l'inhibition GABAergique est cruciale dans la régulation de l'excitabilité neuronale et les interneurones GABAergiques représentent 10 à 15% des cellules. Pharmacologiquement, le récepteur $GABA_A$ peut être modulé par de nombreuses substances dont les benzodiazépines (modulateur allostérique positif), la bicuculline (antagoniste compétitif) et la picrotoxine (antagoniste non compétitif) (Lee and Maguire 2014; Wu and Sun 2015; Pelkey et al. 2017). Plusieurs travaux ont montré que la modulation pharmacologique des récepteurs GABA impactait directement la capacité de la synapse à moduler son efficacité de transmission à long terme, un phénomène que nous allons aborder ci-dessous (Wigström and Gustafsson 1983; Wagner and Alger 1995).

b) Le phénomène de plasticité synaptique

La mémoire, comme présentée précédemment, n'est pas un processus unique dans la mesure où on distingue la mémoire déclarative de la mémoire non déclarative, dont les mécanismes cellulaires sous-jacents diffèrent. Toutefois, dans les deux cas, ces mécanismes incluraient une modification de la force des connexions entre neurones, comme initialement proposé par Ramón y Cajal en 1911. C'est en 1949, cependant, que le neuropsychologue Donald Olding Hebb énonça la théorie d'une modification de la force de transmission synaptique lors d'un phénomène d'apprentissage et de mémorisation, basé sur l'activité simultanée des neurones pré- et postsynaptiques, notamment dans le contexte du conditionnement classique (Hebb 1949). Finalement, il a fallu attendre 1973 pour obtenir des preuves expérimentales de ce concept chez l'animal. En effet, c'est chez le lapin anesthésié que Timothy Bliss et Terje Lomo ont observé un renforcement à long terme de la communication entre les neurones de l'hippocampe suite à des stimulations électriques à haute fréquence, un phénomène qu'ils ont nommé potentialisation à long terme (PLT) (Bliss and Lomo 1973). Ainsi, ces chercheurs furent les pionniers de la PLT à laquelle la communauté scientifique s'intéresse encore particulièrement. L'intérêt porté à ce phénomène a permis, depuis, la découverte d'autres phénomènes de modulation de l'efficacité de transmission entre deux neurones qui se manifestent à court ou à long terme, avec notamment le phénomène inverse de la PLT : la dépression à long terme (DLT) décrite dès 1977 (Lynch et al. 1977). Dans cette partie, nous allons détailler les mécanismes cellulaires et moléculaires qui interviennent dans ce phénomène de plasticité synaptique à la base de la formation de la mémoire qui peut durer des jours, des mois voire des années et auxquels mes études se sont intéressées suite à une exposition à l'éthanol.

La potentialisation à long terme

La PLT repose sur la capacité d'une synapse à augmenter l'efficacité de transmission de l'information de façon durable. La mise en place de cette PLT dépend de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont été clairement mis en évidence, bien que certains demeurent méconnus. L'identification des acteurs de la PLT a été possible grâce à la mise en place de protocoles expérimentaux menés *ex vivo*, sur tranches de cerveau de

rongeurs. A ce titre, c'est l'hippocampe dont le rôle dans la mémoire humaine a été mis en exergue avec le cas H.M. et dont l'organisation architecturale est bien définie qui a suscité le plus d'attention. Ainsi, le déclenchement et le maintien de la PLT repose sur une cascade d'évènements successifs que nous allons détailler, en portant un intérêt particulier à la PLT dépendante des récepteurs NMDA ayant lieu dans l'aire CA1 de l'hippocampe.

L'induction de la PLT

Ex vivo sur tranche d'hippocampe, on observe une PLT dans le champ CA1 après application de stimulations électriques à haute fréquence, généralement de 20 à 100Hz, délivrées sur les collatérales de Schaffer, voie afférente à CA1. Il a été démontré, du reste, une corrélation positive entre le nombre de stimulation et l'amplitude de la PLT (Larson and Munkácsy 2015). De façon intéressante, cette PLT n'est pas observée lorsque les tranches sont traitées avec un antagoniste du récepteur NMDA, l'AP5 (Collingridge et al. 1983) ou avec des chélateurs de calcium (Lynch et al. 1983) suggérant que l'activation du récepteur NMDA contrôle le déclenchement de la PLT. D'ailleurs, *in vivo*, bloquer le récepteur NMDA perturbe la mémoire hippocampo-dépendante (Morris et al. 1986; Tsien et al. 1996), reliant ainsi la PLT aux processus mnésiques. Comme décrit précédemment, le récepteur NMDA est un canal voltage-dépendant qui est, au potentiel membranaire de repos, bloqué par un ion Mg^{2+}. L'arrivée d'un potentiel d'action dans le neurone présynaptique entraine la libération de glutamate dans la fente synaptique. La liaison du glutamate sur le récepteur AMPA post-synaptique génère un influx d'ions Na^{+}, conduisant à la dépolarisation de ce dernier. Lorsque la dépolarisation est suffisamment importante, l'ion Mg^{2+} des récepteurs NMDA postsynaptiques est évacué et il y a un influx de Ca^{2+} dans le neurone. C'est cet influx de Ca^{2+} qui régit l'induction de la PLT. En effet, l'élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et la formation d'un complexe Ca^{2+}-calmoduline active la protéine kinase II dépendante du complexe Ca^{2+}-calmoduline (CAMKII) qui à son tour active la voie de l'adénylate cyclase (Lisman et al. 2002). Cette dernière permet la formation de l'AMP cyclique (AMPc) et s'ensuit l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Roberson and Sweatt 1996). La PKA renforce l'activité de la CAMKII en inhibant la protéine phosphatase 1 (PP1), une inhibition responsable de l'autophosphorylation de la CAMKII, donc du renforcement de son activité même après la vague calcique intracellulaire. Finalement, la CAMKII et la PKA induisent la voie des protéines

kinases activée par des agents mitogènes (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) et notamment ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) dont l'activation semble nécessaire dans l'induction de la PLT dans CA1 (English and Sweatt 1997).

L'expression et le maintien de la PLT

En conséquence de l'activation des voies de signalisation intracellulaires citées ci-dessus, une augmentation de l'activité ainsi qu'un mouvement des récepteurs AMPA vont avoir lieu. En effet, l'activation de la CAMKII va conduire à la phosphorylation des récepteurs AMPA ancrés dans la membrane post-synaptique, cette phosphorylation au niveau de la sérine S831 de la sous-unité GluR1 entraine une augmentation de la conductance sodique du récepteur (Kristensen et al. 2011). L'activation de la PKA conduit à la phosphorylation de la sérine S845 de GluR1, ce qui augmente la probabilité d'ouverture du canal (Banke et al. 2000; Sun et al. 2005). De plus, une insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique est observée, et ceux-ci proviennent de vésicules de stockage contenues dans les endosomes. Cette exocytose de récepteur AMPA semble dépendre de la phosphorylation de GluR1 S831 et 845, mais également de protéines telles que la protéine 4.1N dont l'activation semble dépendre de la protéine kinase C (PKC) et de SNAP-47 (Lin et al. 2009; Jurado et al. 2013). Ainsi, l'ensemble de ces modifications conduit à l'augmentation de l'influx de Na^+ à travers les récepteurs AMPA et donc de la transmission synaptique, c'est l'expression de la PLT. Finalement, l'expression de cette PLT peut être maintenue pendant plusieurs heures, jours voire semaines. En fait, comme tout processus cellulaire qui perdure dans le temps, cela engage la transcription génique et la synthèse de protéines (Abraham and Williams 2003). Lors de la phase d'induction de la PLT, plusieurs voies de signalisation cellulaires sont activées par l'élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et celles-ci convergent sur ERK. L'activation de ERK va conduire à l'activation de facteurs de transcription, dont la protéine de fixation aux éléments de réponse à l'AMP cyclique, CREB (*cAMP response element binding*), dont la délétion chez la souris entraine un blocage de la PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Bourtchuladze et al. 1994). CREB jouera un rôle à son tour dans l'activation de gènes dits « immédiats précoces » avec notamment *c-Fos*, *Arc et Zif-268*, ainsi que dans l'activation du facteur neurotrophique *bdnf*. D'ailleurs, la protéine Arc se lie à l'actine, conduisant au remodelage et à la croissance des épines dendritiques (Lynch 2004; Patterson and Yasuda

2011). Les gènes dits « immédiats précoces » jouent aussi un rôle de facteur de transcription pour l'induction de gènes de réponse tardive. Ces derniers vont générer des protéines structurales, des enzymes, des canaux ioniques ou encore des neurotransmetteurs et des récepteurs (notamment AMPA) qui seront impliqués dans la croissance neuronale et le maintien de la plasticité. Ainsi et dans la mesure où le maintien de la PLT est perturbé par des inhibiteurs de la synthèse protéique dans CA1 (Stanton and Sarvey 1984), le maintien de la PLT est régi par l'expression de gènes et la synthèse protéique (Figure 9).

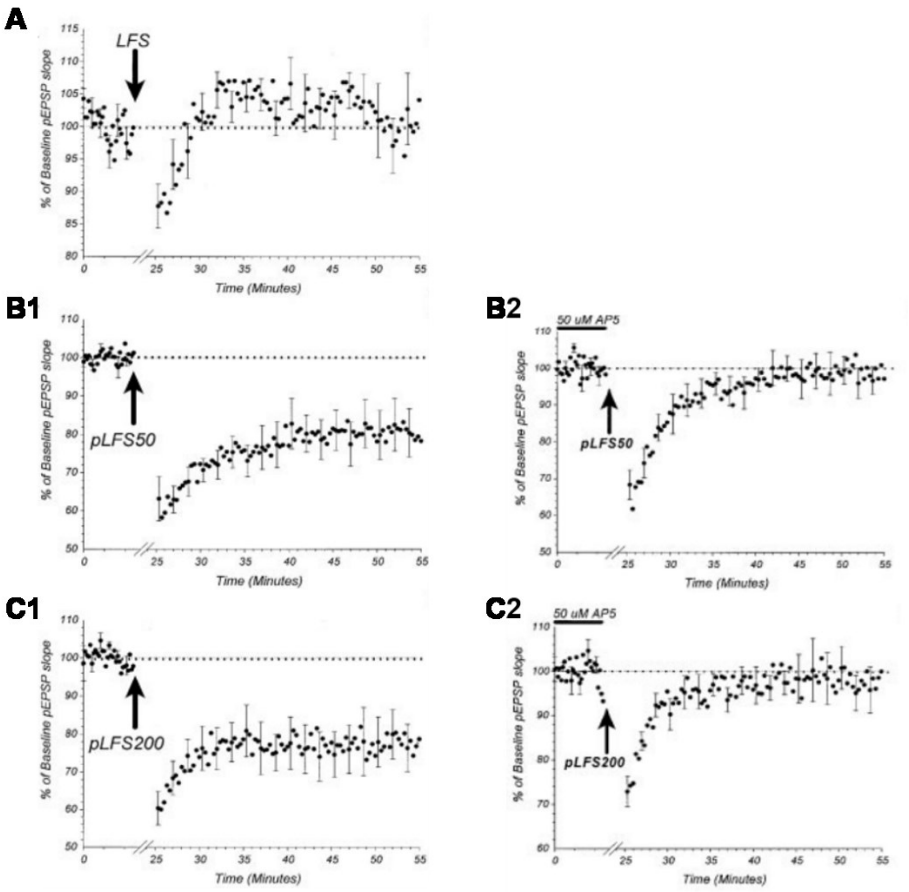
La dépression à long terme

L'existence d'un phénomène inverse à la PLT a été mise en évidence plus tardivement. En effet, la communauté scientifique avait déjà constaté qu'il était possible d'inverser la PLT en appliquant des stimulations à basse fréquence, un phénomène appelé « dépotentiation » (Staubli and Lynch 1990), mais il a fallu attendre 1992 pour qu'une diminution durable de l'efficacité de transmission entre les neurones, non consécutive à une PLT, soit observée : c'est la DLT. En effet, Dudek et Bear ont appliqué des stimulations électriques à basse fréquence (900 stimulations délivrées à 1Hz : on parle de LFS 900) au niveau des collatérales de Schaffer et ont observé une diminution de la pente du PPSE dans l'aire CA1 de l'hippocampe qui persiste après 1h d'enregistrement. Dans cette étude, ils montrent que ce phénomène est bloqué par l'AP5, au même titre que la PLT, suggérant ainsi que la DLT dépend également du récepteur NMDA (Dudek and Bear 1992). Bien que depuis, des DLT indépendantes du récepteur NMDA aient été mises en évidence, nous allons focaliser notre propos sur la DLT NMDA-dépendante, car c'est celle-ci que nous avons identifiée comme étant particulièrement sensible au *binge drinking* dans nos études.

L'induction de la DLT

Nous avons précédemment mentionné la LFS 900 comme étant le protocole de stimulation à basse fréquence ayant permis la mise en évidence expérimentale de la DLT *ex vivo* dans CA1. Ce protocole ne fait toutefois pas l'unanimité dans le déclenchement de la DLT. En effet, des travaux montrent que la LFS 900 ne suffit pas toujours à déclencher la DLT dans CA1, alors qu'elle est déclenchée par l'application d'un protocole électrique où les

stimulations sont appariées (*paired-pulse*) avec un intervalle entre chaque stimulation de 50 ou 200ms, répété 900 fois à une fréquence de 1Hz (pLFS 50-900 ou pLFS 200-900) (Thinschmidt et al. 2003). Les mêmes auteurs ont d'ailleurs montré que la DLT déclenchée par ces protocoles de pLFS était également abolie par l'AP5, au même titre que la LFS 900, donc dépendante des récepteurs NMDA (Figure 8). De manière plus précise, le succès d'un protocole de stimulation pour la DLT pourrait dépendre de l'âge puisque les animaux sont plus âgés dans les travaux de Thinschmidt que dans ceux de Dudek et Bear 1992. Au niveau de la synapse, l'arrivée du train de potentiel d'action à basse fréquence conduit à une faible libération de glutamate et ainsi, un faible influx de Na^+ dans le neurone post-synaptique. Ce faible influx de Na^+ entraine une dépolarisation modeste du neurone post-synaptique et le déblocage des récepteurs NMDA est plus faible que lors de l'arrivée d'un train de potentiels d'action à haute fréquence. Ainsi, *in fine*, le Ca^{2+} entre en faible concentration dans le neurone post-synaptique et forme alors un complexe avec la calmoduline. Alors que dans le phénomène de PLT-NMDA dépendante, ce sont des protéines kinases qui sont activées, dans le phénomène de DLT-NMDA dépendante, la formation du complexe Ca^{2+}-calmoduline active la protéine phosphatase 2B (PP2B) ou calcineurine. Celle-ci va, à son tour, activer la protéine phosphatase 1 (PP1) en inhibant la protéine *inhibitor-1* (I-1) (Mulkey et al. 1993, 1994). Ainsi, la direction que prendra la plasticité semble dépendre de la concentration en Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique. Une hypothèse permettant d'expliquer l'activation préférentielle de la calcineurine ou de la CAMKII par la formation du complexe calcium-calmoduline pourrait reposer sur une différence d'affinité. En effet, le complexe Ca^{2+}-calmoduline fixe la calcineurine à une constante de dissociation à l'équilibre K_d de 28pM alors qu'elle est de 52nM pour la CAMKII (Quintana et al. 2005). Or, on sait que l'affinité du ligand pour sa cible est d'autant plus forte que la constante de dissociation à l'équilibre est faible. Ainsi, dans le cadre d'une faible entrée de Ca^{2+}, c'est la calcineurine qui va se lier en premier au complexe Ca^{2+}-calmoduline. En revanche, lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est plus importante, cela va conduire à la liaison de la CAMKII avec le complexe Ca^{2+}-calmoduline. S'ensuit alors une inhibition de la PP1 - activée par la calcineurine - par la PKA. Ainsi, la voie du déclenchement et du maintien de la PLT sera favorisée par rapport à celle de la DLT.

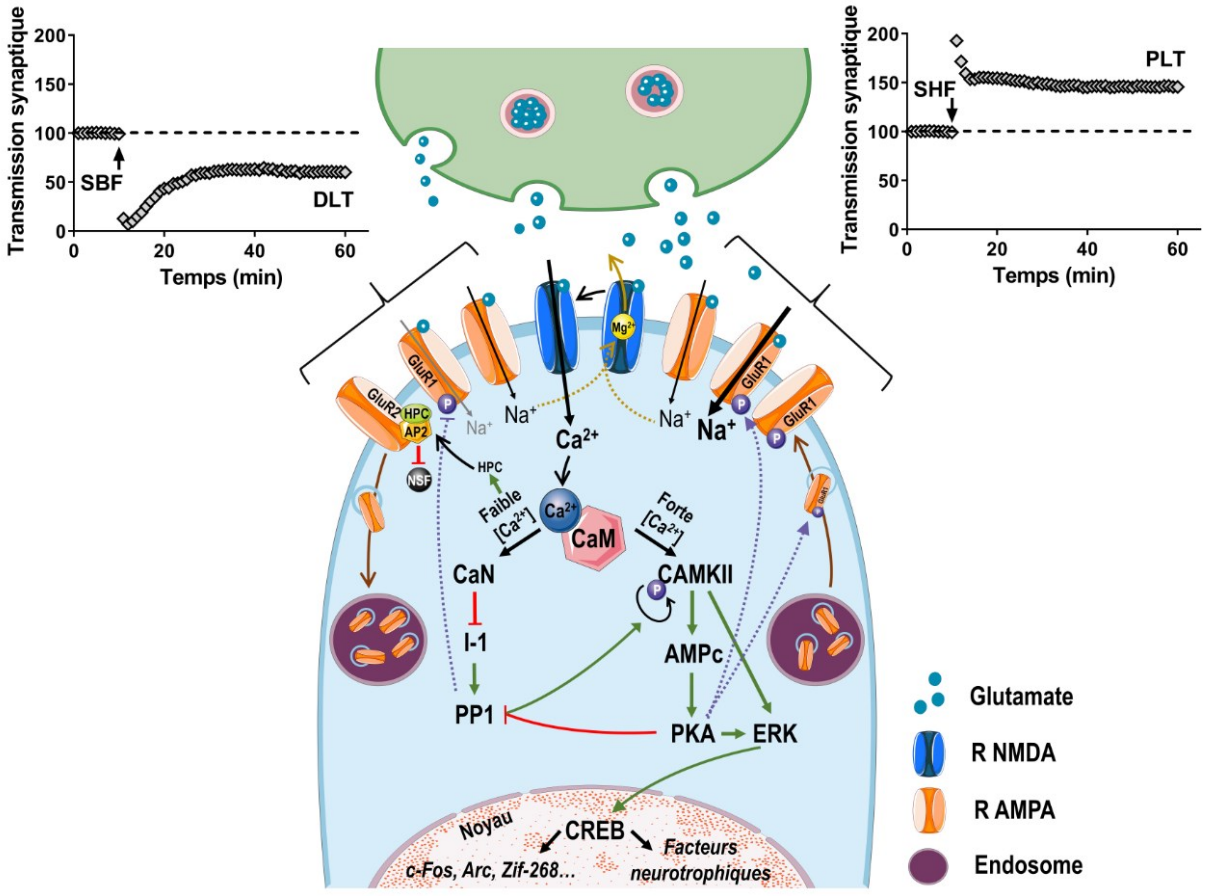


<u>Figure 8</u> : Le déclenchement de la DLT dans CA1 dépend du protocole de stimulation électrique. A) La DLT est absente suite à l'application de la LFS 900. B1-C1) Les pLFS 50-900 et 200-900 parviennent à induire une DLT. B2-C2) La DLT induite par les pLFS 50-900 et 200-900 est NMDA dépendante. Ces résultats sont issus des travaux de Thinschmidt et al., 2003.

<u>L'expression et le maintien de la DLT</u>

Au cours de la DLT, et à l'inverse de la PLT, l'activation de PP1 suite à un protocole de stimulations électriques délivrées à basse fréquence va entrainer la déphosphorylation de GluA1 sur la S845, ce qui va entrainer une diminution de la conductance sodique du récepteur AMPA ainsi qu'une diminution de sa probabilité d'ouverture (Banke et al. 2000; Lüthi et al. 2004). De plus, l'activation de la phosphatase PP1 s'accompagne d'une diminution du nombre de récepteurs AMPA au sein de la membrane post-synaptique. En effet, plusieurs études identifient la sous-unité GluA2 comme médiatrice de l'endocytose des récepteurs AMPA. Au niveau basal, la sous-unité GluA2 interagit directement avec le facteur sensible au N-éthylmaléimide (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*, NSF), un facteur impliqué dans la fusion des vésicules de neurotransmetteurs à la membrane et entrainant la stabilisation de l'ancrage

du récepteur à la membrane. Le site NSF de la sous-unité GluA2 ne fixe pas seulement le NSF mais également le complexe adaptateur pour la clathrine 2 (*clathrin adaptator complex*, AP2). Lors du phénomène de DLT, le Ca^{2+} active l'hippocalcine qui liera AP2. La formation de ce complexe induit l'occupation du site de fixation de NSF sur GluA2 par l'AP2, empêchant ainsi la fixation de NSF sur son récepteur et induisant l'endocytose des récepteurs AMPA (Lee et al. 2002). D'autre part, la DLT semble associée à une diminution de la libération pré-synaptique de glutamate sous l'effet du monoxyde d'azote (NO), qui agit comme un messager rétrograde (Stanton et al. 2003) (Figure 9).

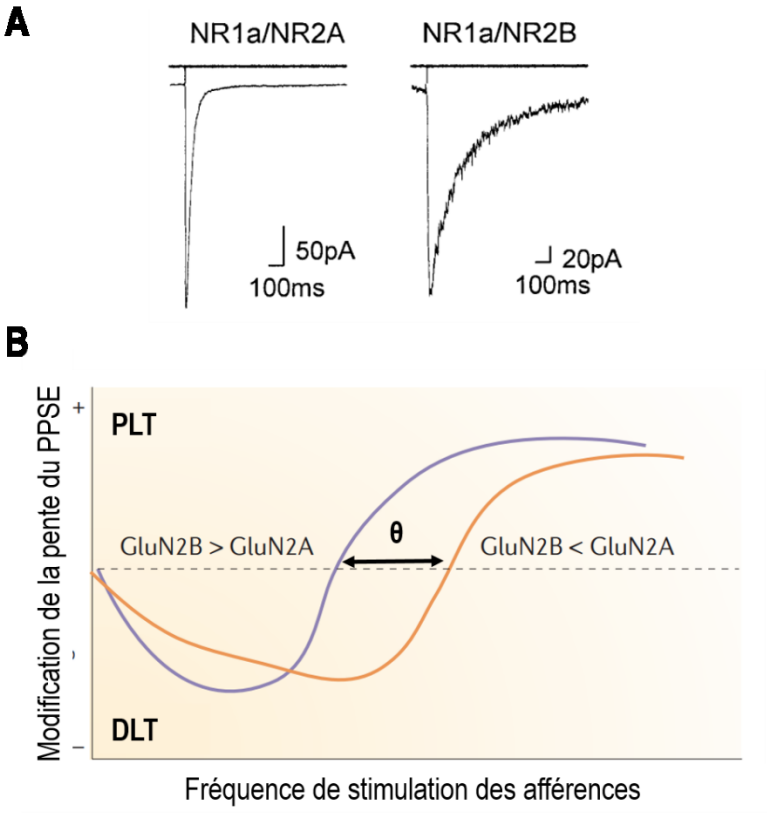


<u>Figure 9 :</u> Représentation schématique des différents processus impliqués dans la plasticité synaptique bidirectionnelle dépendante des récepteurs NMDA. HPC : hippocalcine ; AP2 : clathrin adaptator complex ; NSF : N-éthylmaléimide ; CaM : calmoduline ; CaN : calcineurine ; PP1 : protéine phosphatase 1 ; I-1 : *inhibitor-1* ; CAMKII : protéine kinase II dépendante du complexe calcium calmoduline ; AMPc : AMP cyclique ; PKA : protéine kinase A ; ERK : *extracellular signal-regulated kinases* ; CREB : cAMP response element binding. Source : C. Deschamps

Le phénomène de métaplasticité

La métaplasticité est définie comme la plasticité de la plasticité synaptique, c'est-à-dire qu'il s'agit de la modification des propriétés de plasticité d'une synapse. Ainsi, il faut penser que pour chaque synapse glutamatergique, les stimulations présynaptiques efficaces pour déclencher de la PLT ou de la DLT diffèrent et sont influencées par les expériences passées. Nous avons précédemment abordé la modulation de la conductance calcique du récepteur NMDA en fonction de sa composition en sous-unités. Pour rappel, les récepteurs di-hétéromères GluN1/GluN2A ont une probabilité d'ouverture supérieure aux di-hétéromères GluN1/GluN2B mais le temps d'inactivation du canal GluN1/GluN2B est plus long que celui du canal GluN1/GluN2A (Figure 10A). La concentration en Ca^{2+} entrant dans le neurone post-synaptique est, comme nous l'avons vu précédemment, cruciale pour la direction de la plasticité synaptique. De fait, la direction de la plasticité synaptique est influencée par la composition en sous-unités des récepteurs puisque les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B laisseront entrer plus de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, comparativement aux récepteurs qui portent la sous-unité GluN2A. Ainsi, si nous prenons en considération les niveaux d'expression en sous-unités dans le cerveau au cours du développement et notamment l'inversion de la balance GluN2A/GluN2B entre la naissance et l'âge adulte, le niveau d'induction de la plasticité synaptique pour un même protocole de stimulation électrique devrait différer. En effet, ceci pourrait expliquer que la LFS 900 à 1 Hz qui déclenche une DLT de 24% dans l'aire CA1 chez le rat juvénile (12-20 jours), ne déclenche que 11% de DLT chez le rat jeune adolescent (31-40 jours), alors que ce même protocole de stimulation peine à déclencher une DLT chez le rat en fin d'adolescence ou à l'âge adulte (Kemp et al. 2000). Toutefois et de façon intéressante, dans ces mêmes travaux, la DLT NMDA-dépendante est aisément observée chez le rat adulte suite à une LFS 1800 à 1Hz. Ainsi, avec l'âge, il semble nécessaire d'augmenter le nombre de stimulations électriques pour induire une DLT. Une hypothèse pour expliquer cette évolution repose sur le ratio d'expression GluN2A/GluN2B : en effet, chez le rat juvénile, la sous-unité GluN2A est moins présente que GluN2B, alors que c'est l'inverse à l'âge adulte. En 2013, Paoletti et collaborateurs ont rapproché ce ratio GluN2A/GluN2B de la théorie de Bienenstock, Cooper et Munro, une théorie selon laquelle il existe un seuil θ qui représente la fréquence de stimulation des afférences au-delà de laquelle une PLT sera déclenchée, et en dessous de laquelle une DLT sera favorisée (Bienenstock et al.

1982). Selon Paoletti et coll., un ratio GluN2A/GluN2B faible (GluN2A<GluN2B) favoriserait le déclenchement de la PLT, alors qu'un ratio élevé (GluN2A>GluN2B) favoriserait le déclenchement de la DLT (Paoletti et al. 2013) (Figure 10B). Ainsi, lorsque la modulation du ratio GluN2A/GluN2B modifie le seuil θ de déclenchement de la plasticité synaptique, on parle de métaplasticité.



<u>Figure 10</u> : **Composition en sous-unités du récepteur NMDA et métaplasticité.** A) Temps d'inactivation des di-hétéromères GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B, résultats issus des travaux de Vicini et al., 1998. B) Adaptation de la courbe BCM à la composition en sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA, adapté de Paoletti et al., 2013.

Au total, l'ensemble de ces informations indique que la synapse est capable de moduler à la hausse ou à la baisse son efficacité à transmettre l'influx nerveux et ce de façon durable. Bien que depuis sa découverte dans l'hippocampe, la plasticité synaptique bidirectionnelle ait été mise en évidence dans un grand nombre d'autres structures cérébrales (Artola et al. 1990; Li et al. 1998), nous allons nous intéresser aux processus cognitifs et au phénomène de plasticité synaptique sous-jacent dans l'hippocampe dans le contexte d'une exposition à l'éthanol.

4- Effets de l'alcoolisation aiguë et chronique dans les tests d'apprentissage chez le rongeur

Les effets de l'éthanol sur la mémoire hippocampo-dépendante ont été décrits à la fois dans un contexte d'alcoolisation chronique et d'alcoolisation aigüe. Ici, dans la mesure où nous nous intéressons particulièrement à des expositions à l'éthanol pendant l'adolescence, nous séparerons les données obtenues à l'âge adulte de celles obtenues à l'adolescence. De plus, nous présenterons les études en fonction de la présence, ou non, d'une période de sevrage.

La consommation d'éthanol pendant 30 semaines dans l'eau de boisson ne perturbe pas la mémoire spatiale des rats adultes, lorsque le test est réalisé durant la période d'alcoolisation (Lukoyanov et al. 2000). En revanche, la mémoire de peur conditionnée liée au contexte est perturbée suite à un paradigme de consommation d'éthanol en libre choix de 21 jours chez la souris adulte, alors que les animaux consomment toujours de l'éthanol. Toutefois, les auteurs ne rapportent pas d'effet de l'éthanol dans le test de reconnaissance de nouvel objet ou dans le labyrinthe à 8 bras (Stragier et al. 2015). Ces études suggèrent des atteintes d'apprentissages spécifiques lorsque les animaux sont alcoolisés chroniquement et toujours sous l'effet pharmacologique de l'éthanol, qui semblent concerner les conditionnements classiques mais pas la mémoire spatiale ou de reconnaissance. Pourtant, l'administration intra-péritonéale (i.p.) d'éthanol 2,5g/kg une fois par jour pendant 4 jours, 30 minutes avant chaque phase d'entrainement, perturbe l'acquisition dans la tâche de piscine de Morris chez des animaux adultes, alors qu'une dose plus faible (0,5g/kg) n'a pas d'effet (Acheson et al. 2001). Une différence notable entre ces études concerne les éthanolémies atteintes, qui sont plus faibles dans les protocoles d'alcoolisation par voie orale. Ainsi, face à ces résultats, nous pourrions suggérer qu'à l'âge adulte, des éthanolémies faibles (0,5-0,7g/L) suffisent à perturber les apprentissages par conditionnement classique tandis qu'il faudra atteindre une éthanolémie plus élevée (≈ 2,5g/L) pour perturber l'apprentissage spatial.

Si nous nous intéressons maintenant aux effets à distance d'une exposition chronique à l'éthanol à l'âge adulte, Blokland et collaborateurs (1993) ont montré une absence d'effet sur la mémoire spatiale 6 semaines après la fin du paradigme d'alcoolisation de 26 semaines

par l'eau de boisson (Blokland et al. 1993), rejoignant les études précédemment décrites. En revanche, l'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y est perturbée chez la souris adulte, 24h après la fin d'une exposition à l'éthanol en libre choix dans l'eau de boisson d'une durée de 21 jours (Ebada et al. 2014). Une perturbation similaire de la mémoire de travail est rapportée 4 jours après un paradigme d'alcoolisation permettant de maintenir un niveau d'intoxication qui s'apparente au TUA durant 4 jours. Plus précisément, il s'agit d'une exposition à l'éthanol 5g/kg par voie intra-gastrique (i.g.) suivie d'administrations répétées d'éthanol i.g. toutes les 8h pendant 4 jours, dont la dose est adaptée, sur la base d'une échelle, à l'état d'intoxication de l'animal. Cette dose peut varier entre 0 et 5g/kg et se situe en moyenne à 3g/kg (West et al. 2018). Finalement, des souris soumises à une consommation d'éthanol dans l'eau de boisson dès l'âge de 7 semaines et pendant 5 mois présentent des déficits cognitifs dans le test de reconnaissance de nouvel objet, après deux semaines de sevrage (Pascual et al. 2011). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique qu'une consommation chronique d'éthanol à l'âge adulte impacte les processus mnésiques hippocampo-dépendants. On note toutefois des divergences qui pourraient s'expliquer par la durée du paradigme d'exposition à l'éthanol, l'éthanolémie atteinte ou encore la présence ou non d'une période de sevrage. Outre les effets d'une consommation chronique d'éthanol à l'âge adulte, la communauté scientifique s'est également intéressée aux effets d'une exposition répétée à l'éthanol durant l'adolescence.

Chez le rat ou la souris, le deuxième mois de vie correspond à l'adolescence (Semple et al. 2013; Schneider 2013) avec d'importants processus de maturation cérébrale. La question d'un effet de l'âge et donc du niveau de maturation du SNC reste donc posée. Plusieurs études se sont intéressées à cet aspect. Concernant les effets immédiats d'une exposition à l'éthanol débutant à l'adolescence sur les processus mnésiques, les travaux de Garcia-Moreno et Cimadevilla (2012) montrent une perturbation de la mémoire de reconnaissance de nouvel objet ainsi que de la mémoire de reconnaissance spatiale chez des animaux soumis à un paradigme d'alcoolisation dans l'eau de boisson débutant à P21 pour une durée de 10 semaines, le test étant réalisé sans période de sevrage (García-Moreno and Cimadevilla 2012). D'ailleurs, dans des conditions similaires d'exposition à l'éthanol d'une durée de 6 semaines, les animaux présentent des déficits de mémoire spatiale alors qu'ils sont toujours sous l'effet pharmacologique de l'éthanol (Baradaran et al. 2021). Ces résultats obtenus dans le contexte

d'une exposition chronique à l'éthanol par voie orale débutant à l'adolescence pourraient marquer une différence avec les expositions chroniques similaires à l'âge adulte puisque pour rappel, la mémoire spatiale n'était pas perturbée dans le cadre d'une exposition de 30 semaines (Lukoyanov et al. 2000), suggérant une différence de vulnérabilité. En revanche, une exposition à l'éthanol dans l'eau de boisson de seulement 2 semaines ne semble pas suffisante pour entrainer des perturbations cognitives dans la tâche de piscine de Morris. Toutefois et de façon intéressante, lorsque cette exposition à l'éthanol de 2 semaines est suivie d'administrations i.p. d'éthanol 1,5g/kg 30 minutes avant les 5 sessions d'entrainement journalières, l'apprentissage spatial est perturbé (Boulouard et al. 2002). Ceci pourrait suggérer qu'augmenter la période d'exposition à l'éthanol facilite l'apparition d'atteintes de la mémoire spatiale. Toutefois, les travaux de Sircar et Sircar, en 2005, montrent une perturbation de l'apprentissage spatial chez le rat adolescent lorsque l'éthanol est administré i.p. à 2g/kg, 30 minutes avant la session d'entrainement, durant 5 jours (Sircar and Sircar 2005). Dans ce contexte, nous pouvons nous demander si la perturbation cognitive rapportées dans les travaux de Boulouard et coll. (2002) n'est pas seulement due à l'administration i.p. d'éthanol et non à l'ensemble de l'exposition. Ceci suggère à nouveau un effet important de la modalité d'exposition à l'éthanol et donc des éthanolémies atteintes dans la génèse des perturbations cognitives, du moins en ce qui concerne la mémoire spatiale. Finalement et toujours dans les effets au moment de l'alcoolisation, les travaux de Acheson et coll., mentionnés précédemment, montrent que l'administration d'éthanol 2,5g/kg i.p. une fois par jour pendant 4 jours, 30 minutes avant chaque phase d'entrainement de la tâche de piscine de Morris, impacte l'apprentissage indépendamment de l'âge (P70 ou P30) (Acheson et al. 2001).

L'ensemble des études citées précédemment concernent les effets d'expositions à l'éthanol durant l'adolescence sans période de sevrage. Dix-huit jours après une série de 10 expositions journalières à l'éthanol 5g/kg i.g. à l'adolescence, aucune perturbation de la mémoire spatiale n'est rapportée (Coleman et al. 2011). Les effets d'alcoolisations répétées à l'adolescence comprenant des périodes d'abstinence ont également été étudiés : dans un paradigme d'exposition se rapprochant d'une alcoolisation de type *binge drinking* (EtOH 5g/kg ; i.g. ; une fois par jour, deux jours consécutifs suivis de deux jours sans injections, et répété pour un total de 16 injections effectuées de P25 à P54), aucune perturbation n'a été relevée que ce soit

après 9 jours dans le labyrinthe à 8 bras (Vetreno and Crews 2012) ou après 3 semaines dans les tests de piscine de Morris, d'alternance spontanée ou de reconnaissance de nouvel objet (Fernandez and Savage 2017). En revanche, cette dernière est perturbée après 4 mois (Vetreno and Crews 2015). Cette différence avec l'étude de Fernandez et Savage pourrait impliquer la durée de la période d'abstinence (3 semaines et 4 mois, respectivement), et les auteurs suggèrent que ces perturbations qui apparaissent tardivement s'apparentent à du déclin cognitif, dont la probabilité d'apparition est influencée par l'exposition de type *binge drinking* durant l'adolescence. Risher et collègues ont également étudié les effets de l'éthanol à l'adolescence dans un paradigme légèrement moins long que celui présenté précédemment : dans leur étude, la période d'alcoolisation s'étend sur 20 jours, de P30 à P49, pour un total de 10 intoxications éthyliques (EtOH 5g/kg, i.g.). Comme rapporté précédemment, les auteurs n'ont pas relevé de perturbations mnésiques dans le labyrinthe à 8 bras, 20 jours après le dernier épisode d'alcoolisation (Risher et al. 2013). Finalement et de façon intéressante, l'équipe de Consuelo Guerri a rapporté à plusieurs reprises des effets à long terme d'une exposition de type *binge drinking* à l'adolescence, avec un modèle d'alcoolisation intermittente plus court que ceux présentés jusqu'alors. Ici, les animaux reçoivent une intoxication éthylique (3g/kg, i.p.) deux jours consécutifs, suivi de deux jours sans, ce motif étant répété jusqu'à un total de 8 injections effectuées de P25 à P38. Ces auteurs rapportent des perturbations cognitives dans le test de reconnaissance de nouvel objet, que le test soit réalisé le jour suivant la dernière intoxication éthylique ou après 20 jours (Pascual et al. 2007; Montesinos et al. 2015). Les travaux de Tapia-Rojas et collaborateurs apportent tout de même une ombre au tableau puisqu'en 2018, suite à ce même paradigme d'alcoolisation, ils rapportent une perturbation de la mémoire de reconnaissance après 7 jours mais n'observent toutefois plus ce déficit après 21 jours (Tapia-Rojas et al. 2018). La seule différence que l'on peut noter entre ces études est la durée entre la phase d'apprentissage et d'habituation du test de reconnaissance de nouvel objet, puisqu'elle est de 24h dans les travaux de l'équipe de Guerri, et de seulement 4h dans les travaux de Tapia-Rojas. Ainsi, nous pourrions imputer cette divergence de résultats à un effet plus délétère de l'éthanol sur la mémoire à long terme, comparativement à la mémoire à court terme. De plus, une étude très récente soutient l'existence de déficits mnésiques à distance de l'exposition à l'éthanol, dans un modèle de consommation d'éthanol 20% dans l'eau de boisson de P29 à P33 et de P36 à P40 et qui entraine une perturbation dans le test de reconnaissance de nouvel objet à l'âge

adulte (P80). D'ailleurs, dans cette étude, les perturbations cognitives apparaissent à distance de l'alcoolisation puisqu'ils ne sont pas encore apparus 72h après la fin du paradigme d'alcoolisation (Van Hees et al. 2022). Finalement, suite à une série de 11 administrations d'éthanol 4g/kg i.g. espacées de 48h, une perturbation de la mémoire de peur conditionnée liée au contexte est rapportée après 3 semaines chez les animaux ayant été alcoolisés entre P28 et P48, alors que les animaux alcoolisés entre P35 et P55 ne présentent pas ce déficit (Broadwater and Spear 2013). Ce résultat suggère que l'animal est plus vulnérable pendant la période d'adolescence précoce que pendant l'adolescence tardive aux effets de l'éthanol, vis-à-vis de la mémoire contextuelle. Maintenant, que savons-nous des effets d'alcoolisations ponctuelles ? Ne seraient-elles pas à la base des perturbations observées après une répétition des expositions à l'alcool ?

Chez des souris âgées de 9 semaines, l'administration aigue d'éthanol 2,4g/kg i.p. 2 minutes avant la phase d'apprentissage suffit à induire une perturbation dans le test de reconnaissance de nouvel objet. D'ailleurs, cet effet semble dépendre de la dose d'éthanol puisqu'il n'est pas retrouvé pour une dose moindre (1,6g/kg) (Ryabinin et al. 2002). Toutefois, cette plus faible dose perturbe l'apprentissage de peur conditionnée liée au contexte (Weitemier and Ryabinin 2003), suggérant à nouveau des atteintes d'apprentissage spécifiques. De plus, dans la tâche de piscine de Morris, alors que les animaux ont déjà acquis la tâche, l'administration i.p. d'éthanol 2g/kg 30 minutes avant le test perturbe les performances des animaux. De façon intéressante, cet effet n'est pas retrouvé pour des doses plus faibles (entre 0,5 et 1,5g/kg) et aucune différence liée à l'âge n'est notée (P30 vs P70) (Chin et al. 2011; Novier et al. 2012). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que l'administration aiguë d'éthanol impacte l'apprentissage et la restitution de l'information, de façon dose dépendante.

Finalement et de façon intéressante, mon laboratoire de thèse a montré une perturbation de l'apprentissage dans le test de reconnaissance de nouvel objet, 48h après seulement deux épisodes d'intoxication éthylique à 3g/kg, (i.p.) chez le rat adolescent tardif (P45-P55) (Silvestre de Ferron et al. 2015), révélant un effet à distance d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol à l'adolescence. Toutefois, les travaux de Swartzwelder et coll. (2012) ne montrent pas de perturbation mnésique dans le test de reconnaissance de nouvel objet, 72h après une seule exposition à l'éthanol 1,5g/kg, i.p., tant chez le rat adolescent précoce

(P30) que chez le rat adulte (P70) (Swartzwelder et al. 2012), suggérant que la dose et/ou le nombre d'expositions à l'éthanol est insuffisant pour induire des perturbations mnésiques à distance de l'alcoolisation, un résultat qui est d'ailleurs cohérent avec les travaux de Chin et coll. (2011) qui ne montraient pas d'effet de cette même dose d'éthanol sur la mémoire spatiale.

L'ensemble des travaux présentés ci-dessus montrent un effet de l'éthanol, en prise chronique ou aiguë, sur les processus d'apprentissage et de mémorisation. Toutefois, ces effets et notamment le type de mémoire touché semble largement influencé par la période de sevrage, la voie d'administration et en conséquence les éthanolémies atteintes (synthétisé Table 4). Toutefois, bien que des perturbations cognitives soient rapportées dans les modèles chroniques et aigus, les paradigmes d'alcoolisation où l'éthanolémie croît rapidement semblent plus fréquemment associés à des perturbations mnésiques, et la mémoire de reconnaissance est très fréquemment touchée, notamment à distance de l'alcool (Pascual et al. 2007, 2011 ; Montesinos et al. 2015 ; Van Hees et al. 2022). Toutefois, le bilan n'est pas aussi clair en ce qui concerne l'éventuelle vulnérabilité à présenter des perturbations mnésiques à l'adolescence, comparativement à l'âge adulte. Malheureusement, les études précédemment décrites n'ont que très rarement associé leurs résultats comportementaux à des enregistrements de plasticité synaptique dans l'hippocampe et on ne sait donc rien d'une quelconque répercussion de ces modes d'alcoolisation sur les processus cellulaires des phénomènes de mémorisation hippocampo-dépendants et/ou impliquant également l'amygdale. Toutefois, les effets de l'éthanol sur la plasticité synaptique hippocampique ont été rapportés et sont présentés dans la partie suivante.

	Protocole	Age	Sevrage	Test comportemental	Effet cognitif	Référence
CHRONIQUE	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 30 semaines	Adulte	Ø	Piscine de Morris	Ø	*Lukoyanov et al., 2000*
	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 10 semaines	P21	Ø	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Garcia-Moreno et al., 2012*
				Localisation d'objet		
	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 6 semaines	P21	Ø	Piscine de Morris	Perturbation	*Baradajan et al., 2021*
	EtOH 10% libre choix, 21 jours	Adulte	Ø	Peur conditionnée (contexte)	Perturbation	*Stragier et al., 2015*
				Reconnaissance de nouvel objet	Ø	
				Labyrinthe à 8 bras	Ø	
	EtOH 10% dans l'eau de boisson, 2 semaines	Adolescent	Ø	Piscine de Morris	Ø	*Boulouard et al., 2002*
	EtOH 10% dans l'eau de boisson, 2 semaines + EtOH 1,5g/kg i.p. 1x/jour pendant 5 jours				Perturbation	
	EtOH 2g/kg i.p., 1x/jour pendant 5 jours	Adolescent	Ø	Piscine de Morris	Perturbation	*Sircar et Sircar, 2005*
	EtOH 2,5g/kg i.p. 1x/jour pendant 4 jours	Adolescent	Ø	Piscine de Morris	Perturbation	*Acheson et al., 2001*
		Adulte				
	EtOH 0,5g/kg i.p. 1x/jour pendant 4 jours	Adolescent			Ø	
		Adulte				
	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 26 semaines	Adulte	6 semaines	Piscine de Morris	Ø	*Blokland et al., 1993*
	EtOH 10% dans l'eau de boisson, 20 semaines	Adulte	2 semaines	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Pascual et al., 2011*
	EtOH 1% libre choix, 21 jours	Adulte	24h	Labyrinthe en Y	Perturbation	*Ebada et al., 2014*
	EtOH 20% dans l'eau de boisson	P29 à P33 + P36 à P40	72h	Reconnaissance de nouvel objet	Ø	*Van Hees et al., 2022*
			40 jours		Perturbation	
	EtOH 5g/kg puis 3g/kg i.g. toutes les 8h pendant 4 jours	Adulte	4 jours	Labyrinthe en Y	Perturbation	*West et al., 2018*
	EtOH 5g/kg i.g., 1x/jour pendant 10 jours	Adolescent	18 jours	Piscine de Morris	Ø	*Coleman et al., 2011*
	EtOH 5g/kg i.g., 2 jours consécutifs puis 2 jours sans, total de 16 injections	Adolescent	9 jours	Labyrinthe à 8 bras	Ø	*Vetreno et Crews, 2012*
			3 semaines	Piscine de Morris	Ø	*Fernandez et Savage, 2017*
				Labyrinthe en Y		
				Reconnaissance de nouvel objet		
			4 mois	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Vetreno et Crews, 2015*
	EtOH 5g/kg i.g., 2 jours consécutifs puis 2 jours sans, total de 10 injections	Adolescent	20 jours	Labyrinthe à 8 bras	Ø	*Risher et al., 2013*
	EtOH 3g/kg i.p., 2 jours consécutifs puis 2 jours sans, total de 8 injections	Adolescent	24h	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Pascual et al., 2007 ; Montesinos et al., 2015*
			20 jours			

			7 jours	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Tapia-Rojas et al., 2018*
			21 jours		Ø	
	EtOH 4g/kg i.g., 1x toutes les 48h pour un total de 11 administrations	P28-P48	21 jours	Peur conditionnée (contexte)	Perturbation	*Broadwater et Spear, 2013*
		P35-P55			Ø	
AIGU	EtOH 2,4g/kg i.p.	Adulte	Ø	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Ryabinin et al., 2002*
	EtOH 1,6g/kg i.p.				Ø	
				Peur conditionnée (contexte)	Perturbation	*Weitemier et Ryabinin, 2003*
	EtOH 2g/kg i.p.	Adolescent	Ø	Piscine de Morris	Perturbation	*Chin et al., 2011 ; Novier et al., 2012*
		Adulte				
	EtOH 1,5g/kg i.p.	Adolescent			Ø	
		Adulte				
	EtOH ≤ 1g/kg i.p.	Adolescent			Ø	
		Adulte				
	EtOH 3g/kg i.p. 2x à 9h d'intervalle	Adolescent	48h	Reconnaissance de nouvel objet	Perturbation	*Silvestre de Ferron et al., 2015*
	EtOH 1,5g/kg i.p.	Adolescent	72h	Reconnaissance de nouvel objet	Ø	*Swartzwelder et al., 2012*
		Adulte				

Table 4 : Les effets de l'éthanol sur les processus cognitifs hippocampo-dépendants

5- Effets de l'alcoolisation aiguë et chronique sur la plasticité synaptique chez le rongeur

a) Effets de l'éthanol ex vivo

Les premiers travaux considérant l'effet de l'éthanol sur la transmission synaptique ont été réalisés *ex vivo.* Notons qu'une concentration d'éthanol à 20mM *in vitro* correspond théoriquement à une éthanolémie de 1g/L (Deitrich and Harris 1996). Sinclair et Lo, en 1986, sont parmi les premiers à avoir étudié la PLT dans le contexte de l'éthanol. Ils montrent que l'application *ex vivo* de 100 mM d'éthanol inhibe la PLT dans l'aire CA1 de tranches d'hippocampe, au niveau somatique, alors que l'éthanol 50mM n'a pas d'effet sur cette PLT (Sinclair and Lo 1986). L'effet de 100mM d'éthanol sur la PLT dans CA1 est confirmé par Blitzer et collègues sur des tranches issues de rats adultes, dans la région dendritique cette fois. En revanche, les auteurs mettent en évidence un effet de l'éthanol dès 50mM, contrairement à Sinclair et Lo (Blitzer et al. 1990). Blitzer et collaborateurs ne sont d'ailleurs pas les seuls à rapporter un effet de l'éthanol à 50mM puisque Sugiura et collègues rapportent un effet inhibiteur dose-dépendant de l'éthanol sur la PLT, dans la région somatique de CA1 et sur des tranches de rat âgé de 8 à 9 semaines (Sugiura et al. 1995). Swartzwelder et collaborateurs sont les premiers à avoir étudié l'effet de l'âge sur l'inhibition de la PLT induite par l'éthanol dans la région dendritique de CA1. Dans leurs travaux, ils montrent que 60mM d'éthanol inhibe la PLT chez les rats âgés de 15 à 25 jours, alors que la même dose n'a pas d'effet chez les rats âgés de 70 à 100 jours (Swartzwelder et al. 1995; Pyapali et al. 1999). L'inhibition de l'amplitude de la PLT dendritique par l'éthanol *ex vivo* dans CA1 est finalement communément retrouvée dans un grand nombre d'études pour des doses supérieures à 40mM (Schummers et al. 1997; Izumi et al. 2005b; Tokuda et al. 2007; Izumi et al. 2007; Tokuda et al. 2011; Ramachandran et al. 2015). L'effet inhibiteur de l'éthanol sur la PLT ne semble pas spécifique à l'aire CA1 puisque Morrisett et Swartzwelder ont décrit, dans le GD de tranches d'hippocampe issues de rats âgés de P12 à P30, une diminution de l'amplitude de la PLT dendritique en présence de 75mM d'éthanol (Morrisett and Swartzwelder 1993). Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'inhibition de la PLT induite par l'application aiguë d'éthanol,

les études montrent une diminution des courants dépolarisants issus des récepteurs au glutamate de type NMDA (White et al. 1990; Lovinger et al. 1990) et augmente les courants hyperpolarisants issus des récepteurs $GABA_A$ (Weiner et al. 1994). D'ailleurs, Izumi et collaborateurs montrent en 2005 que le blocage de la PLT induit par l'éthanol est corrigé par l'application de l'antagoniste des récepteurs $GABA_A$, la picrotoxine, renforçant l'idée que l'abolition de la PLT induite par l'éthanol est bien la résultante d'une augmentation des inhibitions dans le réseau neuronal associée à une diminution des excitations (Izumi et al. 2005b). L'effet de l'éthanol *ex vivo* sur la DLT a également été étudié mais bien moins fréquemment. Dans l'aire CA1 de tranches issues de rats âgés de P28 à P35, l'application *ex vivo* d'éthanol 75mM facilite l'induction de la DLT, qui n'est pas induite dans les tranches contrôles (Hendricson et al. 2002). A l'inverse, chez des rats de 30 jours, l'application d'éthanol à 60mM bloque l'induction de la DLT au niveau dendritique dans l'aire CA1 de l'hippocampe, alors que la DLT est bien déclenchée dans les tranches contrôles (Izumi et al. 2005). De même dans le GD, l'application d'éthanol à 50mM diminue l'amplitude de la DLT, dans les tranches d'hippocampe de rats âgés de 28 jours (Sawchuk et al. 2020).

b) Effets de l'éthanol in vivo

Mettons de côté les études concernant les effets aigus, *ex vivo,* de l'éthanol sur la plasticité synaptique pour s'intéresser aux effets d'expositions à l'éthanol *in vivo* chez l'animal. Les travaux de Roberto et collègues, en 2002, ont montré une absence de PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe suite à un paradigme d'exposition chronique à des vapeurs d'éthanol (14h/j, éthanolémie cible 1,5-2g/L) durant 14 jours, les rats débutant l'exposition à P40-45. De façon intéressante, cette PLT était absente à la fois dans le champ somatique de CA1 et dans le champ dendritique, lorsque l'animal était encore alcoolisé et également 24h après la fin de l'exposition. En revanche, alors que la PLT reste diminuée au niveau somatique après 5 jours de sevrage, elle est revenue à la normale au niveau dendritique. Ce résultat souligne l'importance d'étudier les deux signaux (Roberto et al. 2002). Selon la même idée, chez des rats ayant reçu une diète liquide contenant de l'éthanol pendant 18 jours dont l'âge n'est pas

spécifié, la PLT est bloquée dans CA1 et ceci s'accompagne d'une perturbation de la mémoire spatiale, immédiatement après le dernier jour d'alcoolisation (Johnsen-Soriano et al. 2007). Lorsque la diète liquide s'étend sur 28 semaines, la PLT dendritique est diminuée dans CA1 après 5 mois de sevrage. De plus, l'application *ex vivo* d'un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, la bicuculline, corrige la diminution de la PLT (Tremwel and Hunter 1994) suggérant que l'éthanol augmente à long-terme les courants inhibiteurs portés par les récepteurs $GABA_A$. Toutefois, Stragier et coll. (2015) ont mesuré les effets d'une consommation chronique d'alcool dans l'hippocampe de souris. Suite à un protocole d'alcoolisation en libre choix (éthanolémie cible 50-70mg/dL) de 21 jours où l'exposition commence à l'âge de 9 semaines, les auteurs ne rapportent pas d'altération de la PLT au niveau dendritique dans l'aire CA1 de l'hippocampe, enregistrée immédiatement après la fin du protocole d'alcoolisation. Au niveau comportemental et comme abordé dans la partie précédente, les souris présentent des déficits de la mémoire contextuelle mais leur mémoire de reconnaissance et leur mémoire spatiale est intacte (Stragier et al. 2015). Les travaux de Tapia-Rojas et coll. (2018) que nous avons abordés précédemment ont également étudié la PLT au niveau dendritique suite à un paradigme d'alcoolisation intermittente chez le rat adolescent (EtOH 3g/kg i.p. ; 2 jours avec/2 jours sans, total 8 injections). Une semaine après la fin du paradigme d'alcoolisation, l'amplitude de la PLT dendritique est diminuée et celle-ci est complètement abolie après 7 semaines, suggérant un effet inhibiteur progressif et à long terme de l'alcoolisation intermittente de type *binge drinking* à l'adolescence (Tapia-Rojas et al. 2018). L'ensemble des études citées jusqu'alors n'ont étudié que la PLT. En revanche et de façon intéressante, dans CA1, mon laboratoire de thèse avait précédemment montré que l'alcoolisation par l'eau de boisson de la ratte durant la gestation et la lactation (éthanolémie cible ≈ 1g/L) entrainait chez la descendance, à P50, une diminution de l'amplitude de la PLT et une augmentation de la DLT en somatique (Kervern et al. 2015). Fontaine et collaborateurs ont étudié en 2019 l'effet d'une alcoolisation prénatale sur la plasticité synaptique bidirectionnelle. Ils ont montré que l'alcoolisation par diète liquide de rattes gestantes entrainait une diminution de l'amplitude de la PLT et de la DLT en dendritique dans le GD chez la descendance, à P21-28 (Fontaine et al. 2019). Ces résultats sont intéressants puisque l'analyse de la plasticité bidirectionnelle est relativement rare dans une même étude. Chez des souris âgées de 6 à 8 semaines soumises à des vapeurs d'éthanol en deux cycles de 4 jours (EtOH 16h/j, éthanolémie 1,5-1,85g/L) espacés de 3 jours, la DLT mGlu-dépendante est abolie dans l'aire CA1 de l'hippocampe, 4h

après la fin de la période d'alcoolisation (Wills et al. 2017). Egalement, l'alcoolisation de rats par diète liquide débutant à l'âge de 55-60 jours et pendant 38 semaines (éthanolémie 1,5-1,75g/L) inhibe la DLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe, enregistrée 48h après la fin de l'alcoolisation. Les auteurs démontrent également que la DLT induite chez les animaux contrôles est NMDA dépendante (Thinschmidt et al. 2003). Une abolition de la DLT a également été rapportée suite à une alcoolisation intermittente chez le rat adolescent (P33-P57 ; EtOH dans l'eau de boisson à disposition pendant une journée toutes les 72h, EtOH consommé = 10,6 ± 1 g/kg/jour, pour un total de 8 jours d'exposition). Toutefois et de façon intéressante, dans cette même étude, l'alcoolisation chronique (EtOH consommé 9,9 ± 0,6 g/kg en 3 jours) des rats n'entraine pas d'abolition de la DLT, suggérant que ce signal est plus sensible au mode d'exposition à l'éthanol de type intermittent (Contreras et al. 2019). L'ensemble de ces études concerne des modèles d'exposition à l'éthanol relativement longs et qui ont été mis en œuvre pour démontrer des effets délétères de l'alcool sur les processus de plasticité synaptique. De fait, nous ne savons pas à quel moment de l'exposition ces effets sont déclenchés et s'ils évoluent au cours de l'exposition à l'éthanol. Pour cela, il est important de s'intéresser à ce qu'il se passe lors d'expositions à l'éthanol de très courtes durées. De plus, ceci permettrait de définir les événements élémentaires qui pourraient être responsables des effets chez l'adulte d'une consommation chronique d'éthanol. Lorsque les animaux reçoivent deux injections d'éthanol à 2,5g/kg en sous-cutané espacées de 2h à P7, ils présentent une diminution de l'amplitude de la PLT et de la DLT dans CA1 à P30 (Izumi et al. 2005a), indiquant un effet délétère à long terme de seulement deux expositions à l'éthanol durant le développement. Finalement, au sein du laboratoire, nous avons étudié les effets de deux épisodes de type *binge drinking* chez le rat juvénile (P14-21) ou adolescent (P45-55). Lorsque les animaux reçoivent deux intoxications éthyliques (EtOH 3g/kg) espacées de 9h, ils présentent une augmentation de l'amplitude de la PLT, et une abolition de la DLT dans CA1, après 48h. De plus et de façon concomitante, l'apprentissage dans un test de reconnaissance de nouvel objet est perturbé (Silvestre de Ferron et al. 2015; Rabiant et al. 2021; Bertrand et al. 2021). Ces résultats sont très intéressants dans la mesure où ce sont les premiers à montrer une augmentation de l'amplitude de la PLT suite à une exposition à l'éthanol en période de développement cérébral. De plus, l'effet de l'éthanol sur la DLT n'étant que peu étudié, ces résultats confirment que l'éthanol affecte bien la plasticité synaptique bidirectionnelle dans l'hippocampe et ce, dès les premières intoxications éthyliques.

Dans l'ensemble, ces études indiquent que l'éthanol perturbe les processus mnésiques tant sur le plan comportemental que cellulaire. La question est désormais de déterminer par quels mécanismes cellulaires et moléculaires l'éthanol entraine ces perturbations cognitives. En effet, définir ces mécanismes pourrait aider à identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à l'implication des processus épigénétiques et neuroinflammatoires dans les modifications de la plasticité bidirectionnelle somatique et dendritique suite à deux épisodes d'exposition à l'éthanol de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Dans les chapitres suivants, nous allons décrire les processus épigénétiques et neuroinflammatoires qui pourraient être impliqués dans les effets de l'éthanol.

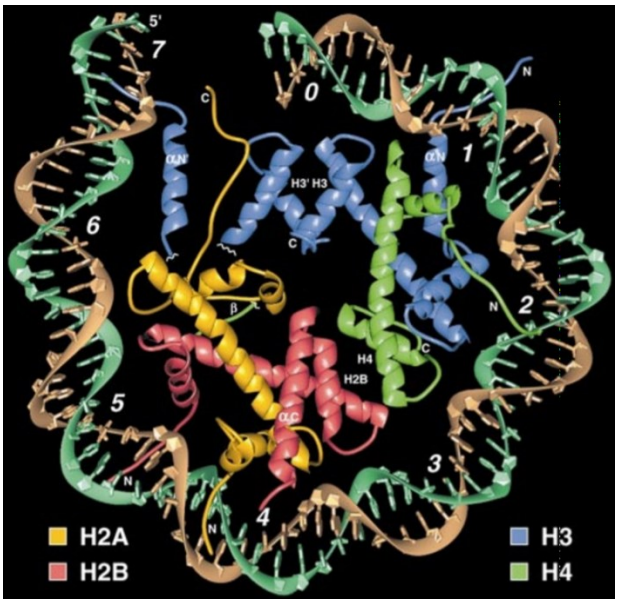
Chapitre III

Les mécanismes épigénétiques

1- Généralités

Le terme épigénétique renvoie aux modifications biochimiques qui se produisent sur (« *epi* ») les gènes. Introduit dans les années 1940, l'épigénétique correspond aux mécanismes qui permettent à deux gènes identiques d'être exprimés différemment dans différents types cellulaires et contextes (Waddington 2012).

L'ADN génomique est organisé et condensé sous forme de chromatine. L'unité de base de la chromatine, appelée nucléosome, se compose de 145 à 147 paires de bases d'ADN génomique enroulées autour d'un octamère d'histones. Les histones sont formées de deux copies des protéines H2A, H2B, H3 et H4 (Figure 11). L'ensemble est maintenu et stabilisé par l'histone de liaison H1. Les nucléosomes sont liés ensembles par de l'ADN dit « de liaison » (Kornberg 1977; Luger et al. 1997). En fonction du cycle cellulaire, la chromatine peut être plus ou moins compactée ; on parle d'euchromatine quand la chromatine est peu condensée et donc accessible aux facteurs de transcription, et à l'inverse, quand la compaction est élevée et que l'ADN est moins accessible aux mécanismes de transcription des gènes, on parle d'hétérochromatine.



<u>Figure 11</u> *:* Structure du nucléosome par radiocristallographie. La double hélice d'ADN est enroulée autour des 4 principaux histones : H2A, H2B, H3 et H4.
Source : Luger et al. 1997

La force électrostatique de l'interaction entre l'ADN génomique et les histones est affectée par des modifications post-traductionnelles qui ont lieu à différentes positions sur les histones. Ces histones sont constituées d'un domaine central globulaire et d'une queue N-terminale plus flexible et électriquement chargée (Jenuwein and Allis 2001) qui renferme plusieurs acides aminés (lysine, arginine, sérine, thréonine…) qui jouent le rôle de substrats pour les modifications post-traductionnelles. Environ 130 modifications post-traductionnelles ont été rapportées (Tan et al. 2011) dont les principales sont la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles des histones va moduler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription (Lee et al. 1993; Kouzarides 2007). En règle générale, ces modifications sont mises en place par des enzymes qui « écrivent » (ou *writers)* et sont éliminées par des enzymes qui vont littéralement les « gommer » (ou *erasers)* (Gardner et al. 2011). Finalement, l'épigénétique renvoie à la modulation de l'état de compaction de la chromatine sans modifications de la séquence d'ADN. Outre les modifications post-traductionnelles concernant les histones, d'autres phénomènes tels que la méthylation de l'ADN, les changements de position du nucléosome, les variants d'histones et les miRNA (ARN miniature) sont également impliqués dans le remodelage de la chromatine (Hwang et al. 2017b).

Parmi ces mécanismes épigénétiques abordés succinctement ci-dessus, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes d'acétylation des histones puisque ce sont eux les plus fréquemment associés avec les processus de mémorisation (Gräff and Tsai 2013). Cependant, l'ajout d'un groupement acétyle n'a pas lieu de façon aléatoire sur les acides aminés des histones. En effet, seules les lysines (K) sont concernées. Pour l'histone H4, l'acétylation peut avoir lieu sur les résidus K5, K8, K12 et K91 ; pour H3, l'acétylation aura lieu sur K9, K14, K18, K23, K27 et K56 ; elle aura lieu sur K5 et K9 pour H2A et sur K5, K12, K15 et K20 et K120 pour H2B (Davie 1997; Yao et al. 2016). En 1964, Allfrey et ses collaborateurs ont montré pour la première fois que l'acétylation de la queue N-terminale de l'histone était fortement corrélée à un renforcement de la transcription (Allfrey et al. 1964). En effet, l'ajout d'un groupement acétyle chargé négativement sur un résidu lysine chargé positivement entraîne la neutralisation électrostatique de la queue N-terminale de l'histone et ainsi, son interaction avec le groupement phosphate chargé négativement de l'ADN est amoindrie (Shahbazian and Grunstein 2007). Au final, l'acétylation des histones induira une décompaction de la chromatine et donc un accès favorisé à l'ADN pour la machinerie transcriptionelle. L'acétylation des histones est un processus dynamique réalisé par des histones acétyltransférases (HAT) qui sont les enzymes qui ajoutent *(writers)* des groupements acétyle aux histones. A l'inverse, les histones désacétylases (HDAC) sont les enzymes qui éliminent *(erasers)* ces groupements acétyle (Kuo and Allis 1998) (Figure 12).

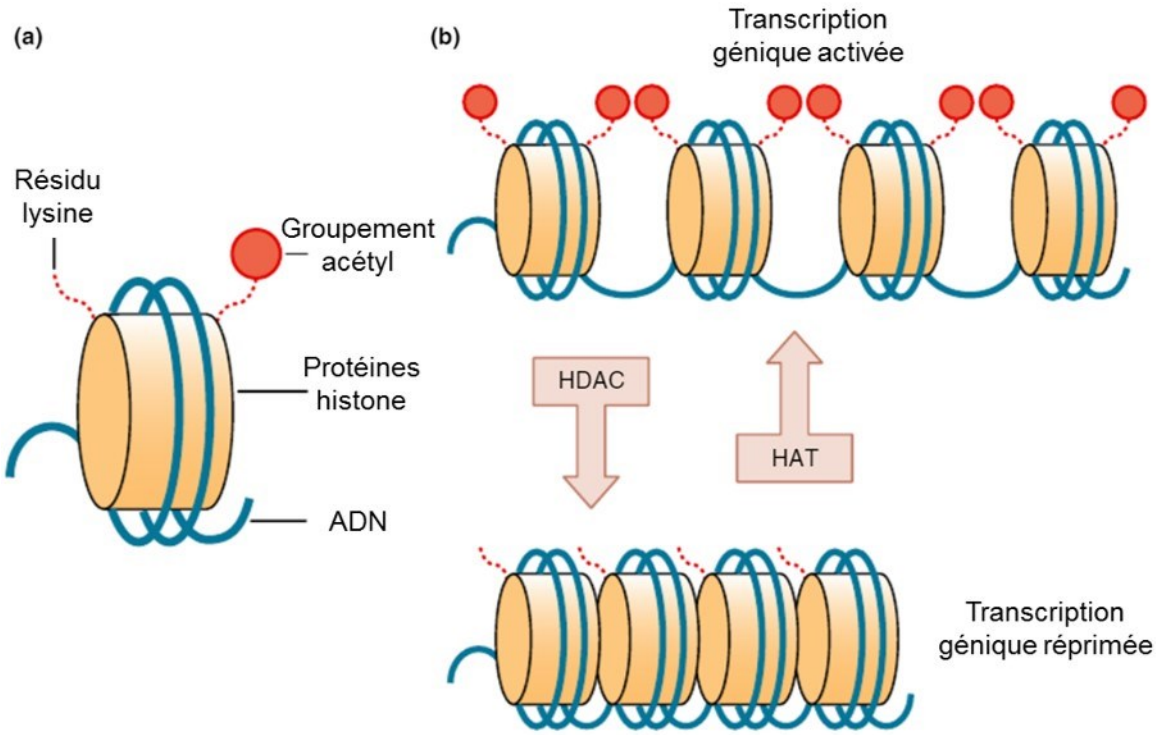


Figure 12 : **Le remodelage de la chromatine par acétylation/désacétylation.** (a) un octamère d'histones enroulé d'ADN. Une queue N-terminale est représentée, un groupement acétyl est fixé sur un résidu lysine. (b) Les différents états de compaction de la chromatine. Les HAT ajoutent des groupements acétyl aux résidus lysine, induisant une décompaction de la chromatine qui permet la transcription génique. Les HDAC retirent ces groupements acétyl, ce qui compacte la chromatine et réprime la transcription des gènes.
Adapté de (Felice et al. 2015)

A ce jour, il a été démontré l'existence de 19 HAT chez les mammifères, organisés en 5 familles basées sur des homologies de séquence (Sheikh 2014) (Table 5).

Famille	p300/CBP	MYST	GNAT	NCOA	HAT liés à la transcription
HAT	p300, CBP	QKF, MOZ, TIP60, MOF, HBO1	GCN5, PCAF, CSRP2BP, HAT1, ELP3	NCOA 1, 3 CLOCK	TAF1, GTF3C1, 2, 4

Table 5 : Les cinq familles de HAT chez les mammifères.

La superfamille des HDAC recense 18 HDAC chez les mammifères qui diffèrent par leur structure, leur fonction enzymatique ou encore leur localisation, permettant ainsi une classification particulière (Michan and Sinclair 2007; Haberland et al. 2009) (Table 6).

Classe	**I**	**IIa**	**IIb**	**III**	**IV**
Isoforme	1, 2, 3 et 8	4, 5, 7, 9	6 et 10	Sirtuines (1-7)	11

Table 6 : Les différents isoformes de HDAC chez les mammifères.

Les HDAC de classe I, II et IV dépendent, pour leur activité, de la présence de zinc dans le milieu tandis que les Sirtuines (classe III) dépendent de la présence de NAD^+. L'ensemble de ces HDAC n'est pas représenté de façon similaire dans toutes les régions du cerveau, comme le montre les travaux de Broide et coll. (Broide et al. 2007). En effet, ces auteurs ont étudié l'expression des HDAC 1 à 11 dans les différentes structures cérébrales du rat adulte et ont découvert que dans l'hippocampe, les HDAC2, 3, 4, 5 et 11 sont les plus exprimées.

Plusieurs études ont montré l'implication des HDAC dans diverses pathologies incluant les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Gräff et al. 2012), des cancers de différentes origines (sein, prostate, colon…) (Halkidou et al. 2004; Zhang et al. 2005; Wilson et al. 2006), les maladies cardiovasculaires et métaboliques (Bagchi and Weeks 2019), mais aussi les TUA avec notamment nos travaux (Botia et al. 2012; Legastelois et al. 2013) mais également ceux d'autres équipes (Al Ameri et al. 2014; Pandey et al. 2015). L'existence d'outils pharmacologiques qui inhibent l'activité des HDAC (les iHDAC) permet dans un premier temps de mieux comprendre leur implication dans des mécanismes physiologiques mais ouvre également des perspectives intéressantes en termes de traitement potentiel. Ces inhibiteurs occupent le site de fixation du Zn^{2+} de l'HDAC, ce qui supprime son activité intrinsèque (Finnin et al. 1999). Il existe plusieurs iHDAC qui vont cibler différentes HDAC (Ahmad Ganai et al. 2016) (Table 7). Cependant, à ce jour et comme montré dans la Table 7, aucun des outils pharmacologiques à la disposition des chercheurs ne permet de

moduler de façon spécifique une seule classe d'HDAC, rendant les résultats des études nécessairement difficiles à interpréter.

iHDAC	HDAC CIBLE
Butyrate de sodium (NaB)	Classes I et IIa
Acide valproïque (VPA)	Classes I et IIa
Trichostatine A (TSA)	Classes I et II
Acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA)	Classes I, II et IV
MS-275	HDAC 1, 2, 3, 9

Table 7 : Quelques iHDAC et leurs cibles.

2- Implication des mécanismes épigénétique dans la mémoire

Les travaux de Levenson et collaborateurs, en 2004, ont été les premiers à suggérer l'implication de mécanismes épigénétiques dans la mémoire hippocampo-dépendante. En effet, leur étude montre que l'acétylation des histones H3 est significativement augmentée de façon transitoire dans l'aire CA1 de l'hippocampe de rats 1h après un apprentissage de peur conditionnée. De plus, l'administration de butyrate de sodium (NaB), un iHDAC, 1h avant la phase d'apprentissage du test, améliore la formation de la mémoire à long terme (test à +24h) (Levenson et al. 2004). Pour rappel, comme indiqué dans la Table 5, la protéine CBP (CREB-Binding Protein) possède une activité HAT et chez des souris génétiquement modifiées qui présentent un allèle du gène CBP codant pour une forme tronquée de la protéine, des perturbations de la mémoire à long terme sont observées notamment dans des tests de peur conditionnée, d'évitement passif et de reconnaissance de nouvel objet. Toutefois, aucune différence n'est observée concernant la mémoire à court terme, évaluée par un test de

labyrinthe en Y (Oike et al. 1999; Bourtchouladze et al. 2003). Ces travaux sont donc les premiers à suggérer un rôle de CBP dans la formation de la mémoire à long terme. Un modèle de souris mutées pour la protéine CBP de façon conditionnelle a également été développé. Cette mutation peut être induite uniquement dans l'hippocampe. A la différence des études précédentes et de manière importante, cette approche expérimentale permet de s'affranchir des conséquences physiopathologiques liées à des anomalies développementales dues à la mutation non ciblée de CBP. Cette étude montre que la délétion de *cbp* dans l'hippocampe induit une diminution de l'acétylation des histones H4K8, H3K14 et H2BK12, associée à une perturbation de la mémoire à long terme dans le cadre d'un paradigme de peur conditionnée et d'un test de localisation d'objet. Ici, l'administration de NaB immédiatement après la phase d'apprentissage du test de localisation d'objet ne prévient pas la perturbation à long terme de la mémoire (Barrett et al. 2011). Pour étudier plus précisément l'implication de la propriété HAT du gène CBP, un modèle murin de mutagénèse ciblée a été développé. Ces souris présentent un gène *cbp* dont l'activité intrinsèque HAT est supprimée (CBP{HAT$^-$}), et cette mutation est inductible de façon ciblée dans le lobe temporal par l'administration de doxycycline à l'âge adulte. Ici, les souris mutantes présentent des déficits dans deux tests de mémoire hippocampo-dépendantes : le test de reconnaissance de nouvel objet et la piscine de Morris. De plus, les souris CBP{HAT$^-$} présentent un niveau d'expression de *c-fos* dans l'aire CA1 de l'hippocampe significativement diminué par rapport aux souris contrôles, indiquant que l'activité HAT de CBP est nécessaire à la transcription du gène *c-fos* dans les neurones de CA1. De façon intéressante, l'administration de Trichostatine A (TSA), un iHDAC, 2h avant la phase d'apprentissage prévient les déficits cognitifs observés chez les souris CBP{HAT$^-$} dans le test de reconnaissance de nouvel objet (Korzus et al. 2004). Selon la même idée, des souris transgéniques présentant une forme tronquée de p300 perdant son activité HAT, échouent dans un test de reconnaissance de nouvel objet, suggérant également un rôle crucial de p300 dans la formation de la mémoire à long terme (Oliveira et al. 2007).

Les études portant sur les effets d'un iHDAC évoquées jusqu'à maintenant concernent une administration d'agents pharmacologiques par voie systémique, ce qui pourrait inclure un éventuel effet périphérique de la substance qui se répercuterait sur l'activité cérébrale. Pour palier cet effet, Vecsey et collaborateurs ont étudié en 2007 l'effet d'un iHDAC administré spécifiquement dans l'hippocampe. Dans le cadre d'un paradigme de peur

conditionnée, les souris reçoivent une injection intra-hippocampique (i.h.) de TSA directement après la phase de conditionnement et montrent de meilleures performances lors de la phase de test. Ici, l'administration de TSA est associée à une augmentation transitoire de l'acétylation des histones H3 dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Dans cette étude, ils démontrent également par quel biais l'acétylation des histones induit une transcription génique nécessaire à la formation de la mémoire à long terme : chez des souris génétiquement modifiées qui présentent une délétion des isoformes α et Δ du facteur de transcription CREB, les auteurs montrent que les souris mutantes échouent dans l'apprentissage de peur conditionnée par rapport aux souris sauvages. De plus, l'administration i.h. de TSA qui améliore la mémoire chez les souris sauvages n'a aucun effet chez les souris mutantes, suggérant que l'amélioration de la mémoire à long terme induite par l'iHDAC requiert CREB (Vecsey et al. 2007). Plus récemment, la même équipe montre que l'administration de NaB améliore la mémoire à long terme chez la souris dans un test de reconnaissance de nouvel objet, ainsi que la durée de rétention de l'information (Stefanko et al. 2009). Outre les iHDAC, les activateurs de HAT sont aussi utilisés pour pallier les déficits mnésiques dans les maladies neurodégénératives. Par exemple, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, le CSP-TTK21, un activateur HAT, prévient les perturbations mnésiques dans le test de piscine de Morris, et cette prévention est associée à une augmentation de l'acétylation des histones H2B dans l'hippocampe (Chatterjee et al. 2018). D'ailleurs, les travaux de Bousiges et coll. (2010) montrent que dans l'hippocampe dorsal de rat, le niveau d'acétylation des histones H4 et H2B est augmenté au niveau des promoteurs de certains gènes tels que *cFos*, *bdnf IV* et *Zif-268* pendant la formation de la mémoire spatiale. Ces résultats étaient associés à l'augmentation de l'activité globale des HAT et de l'expression de CBP et p300, suggérant que ces gènes sont hautement régulés sur le plan épigénétique et participent à la formation de la mémoire spatiale dans l'hippocampe (Bousiges et al. 2010).

Cependant, au regard de la Table 7 présentée page 60, et dans la mesure où l'administration d'un iHDAC montre des bénéfices sur les processus cognitifs, il y a de fortes chances pour que plusieurs isoformes d'HDAC participent à la formation de la mémoire et/ou aux perturbations mnésiques engendrées par divers phénomènes, depuis le vieillissement physiologique jusqu'aux pathologies neurodégénératives ou suite à une prise d'alcool importante, par exemple. Plusieurs études ont mis en relation les différentes HDAC avec des

processus mnésiques. Les travaux de Guan et collaborateurs, en 2009, ont été les premiers à mettre en évidence un rôle spécifique de l'isoforme HDAC2 dans la mémoire chez des souris pour lesquelles HDAC1 ou HDAC2 est surexprimée, les performances dans un test de peur conditionnée et de piscine de Morris sont altérées uniquement chez les souris qui surexpriment HDAC2, bien que le niveau d'acétylation des histones soit significativement diminué dans l'hippocampe des souris dans les deux conditions. De façon intéressante, l'administration préalable de SAHA, un iHDAC, prévient les déficits mnésiques induits par la surexpression de HDAC2. A l'inverse, les souris qui présentent une délétion du gène *hdac2* ($HDAC2^{-/-}$) ont des performances améliorées dans un test de peur conditionnée, ainsi que des niveaux d'acétylation de H4K12, H4K5 et H2B augmentés dans l'hippocampe par rapport aux souris sauvages. Concernant les gènes impliqués dans la formation de la mémoire, les analyses par Western Blot montrent une diminution de l'expression de CREB, de CAMKIIα, ainsi que des deux sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA dans l'hippocampe des souris qui surexpriment HDAC2. A l'inverse, chez les souris $HDAC2^{-/-}$, l'expression de ces mêmes protéines est significativement augmentée. Ces résultats ont été les premiers à indiquer un rôle crucial de HDAC2 dans la mémoire à long terme hippocampo-dépendante (Guan et al. 2009). Suivant la même idée, dans une étude concernant l'exposition aux anesthésiques gazeux durant la gestation qui perturbe la mémoire spatiale des ratons, le niveau d'ARNm de HDAC2 est augmenté dans l'hippocampe, accompagné d'une diminution du niveau d'ARNm de CREB. L'ensemble de ces effets est prévenu par l'administration de SAHA (Luo et al. 2016). De plus, dans un modèle murin de vieillissement, des souris âgées (80 ± 2 semaines) montrent un échec dans un test de reconnaissance de nouvel objet par rapport aux souris adultes (30 ± 2 semaines) accompagné d'une augmentation des taux de protéine HDAC2 dans l'hippocampe, indiquant le rôle spécifique de cette isoforme d'HDAC dans le déclin mnésique lié à l'âge (Singh and Thakur 2014). Pour finir, HDAC2 a aussi été mise en cause dans le déclin cognitif chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Chez des souris transgéniques qui présentent une forme tronquée de la protéine p35 impliquée dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, la mémoire dans un test de peur conditionnée et de piscine de Morris est perturbée. Ces perturbations mnésiques sont accompagnées d'une diminution de l'amplitude de la PLT dans l'hippocampe et d'une augmentation spécifique de HDAC2 dans l'aire CA1 de l'hippocampe, tandis que les niveaux de HDAC1 et 3 sont inchangés. De plus, HDAC2 est significativement enrichie au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans

l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique tels que *bdnf IV*, *glun2a*, *glun2b*, *arc*, *gluR1* et *gluR2* ; et le niveau d'acétylation de H4K12 est diminué au niveau de ces promoteurs. Ces modifications sont accompagnées d'une diminution de l'expression des gènes correspondants. Sur ce constat, les auteurs ont ciblé spécifiquement HDAC2 en administrant dans CA1 un petit ARN en épingle à cheveux (*shRNA*) dirigé contre HDAC2, quatre semaines avant les tests. De manière intéressante, le *shRNA* HDAC2 corrige les perturbations mnésiques, la diminution de l'amplitude de la PLT, l'augmentation de l'expression de HDAC2, la diminution des niveaux d'expression des gènes d'intérêts et la diminution de l'acétylation de H4K12 au niveau des promoteurs induits par la mutation de p35 (Gräff et al. 2012). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle spécifique de HDAC2 dans les processus mnésiques hippocampo-dépendants, probablement parce que HDAC2 est plus fortement représenté au niveau des promoteurs des gènes codant pour des éléments cellulaires impliqués dans la mémoire et la plasticité synaptique. Toutefois, d'autres études ont montré que d'autres HDAC ont également un rôle dans les processus de mémorisation. Par exemple, chez des souris dont l'expression de *hdac3* ($HDAC3^{-/-}$) a été invalidée dans l'hippocampe dorsal, la mémoire spatiale est améliorée dans un test de localisation d'objet par rapport aux souris WT. Toutefois, aucune différence n'est observée dans un test de reconnaissance de nouvel objet. Cette délétion de *hdac3* est associée à une augmentation de l'acétylation de H4K8 et de l'expression de *c-Fos* dans l'hippocampe dorsal, indiquant un rôle de HDAC3 dans la formation de la mémoire spatiale à long terme (McQuown et al. 2011). Concernant les HDAC4 et 5, les travaux de Kim et coll. (2012) montrent que la délétion de *hdac4* chez la souris perturbe la mémoire à long terme dans un paradigme de peur conditionnée, tandis que la délétion de *hdac5* n'a pas d'effet (Kim et al. 2012). Egalement, dans un modèle de lésions cérébrales traumatiques répétées chez le rat qui induit des perturbations cognitives dans un test de reconnaissance de nouvel objet, une augmentation des niveaux d'ARNm des HDAC2, 3, 5 et 11 est retrouvée dans l'hippocampe à différents délais post-lésion (Sagarkar et al. 2019). Enfin, tandis que Guan et ses collaborateurs, en 2009, n'avaient pas trouvé de lien entre HDAC1 et les performances mnésiques dans les tests de peur conditionnée et de piscine de Morris (Guan et al. 2009) une étude met en évidence l'implication de HDAC1 dans ces processus. En effet, chez des souris qui surexpriment spécifiquement HDAC1 dans l'hippocampe, l'extinction du comportement de peur conditionnée est facilitée, sans impacter les autres capacités cognitives. A l'inverse, l'administration intra-hippocampique de MS-275,

un iHDAC, perturbe l'extinction du comportement de peur conditionnée. De plus, ces auteurs montrent que lors de l'extinction du comportement de peur conditionnée, il y a une augmentation de la fixation de HDAC1 sur le promoteur de *c-Fos*, accompagné d'une diminution de l'acétylation de H3K9. Finalement, ces résultats indiquent que lors de l'extinction du comportement de peur conditionnée, HDAC1 est recruté au niveau du promoteur de *c-Fos*, où il désacétyle l'histone H3 et réprime probablement l'expression de *c-Fos* (Bahari-Javan et al. 2012).

Ainsi, l'ensemble de ces études indique une implication des HDAC dans les processus mnésiques. Toutefois comme précédemment suggéré, parmi toutes les HDAC étudiées, HDAC2 semble avoir un rôle prépondérant dans la mémoire hippocampo-dépendante puisqu'elle est très représentée au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans ce processus. C'est donc en accord avec l'ensemble de cette littérature que notre intérêt s'est naturellement porté sur le rôle de HDAC2 dans les effets d'une exposition à l'éthanol sur les processus de mémorisation dans l'hippocampe.

3- Implication de l'épigénétique dans la plasticité synaptique

Si de nombreuses études ont rapporté l'implication des HDAC et/ou HAT dans les processus mnésiques physiologiques ou dans certains déficits, qu'en est-il de nos connaissances sur les mécanismes cellulaires liés aux phénomènes épigénétiques et qui rendraient compte de leurs effets sur la mémoire ? Les premiers travaux qui mettent en relation plasticité synaptique et remodelage de la chromatine ont été réalisés chez l'Aplysie (Guan et al. 2002). L'implication de mécanismes épigénétiques dans les processus cellulaires de mémorisation a également été étudiée en parallèle dans certaines études précédemment présentées. Pour revenir aux travaux de Levenson et coll. (2004), la stimulation de la voie de signalisation de ERK induit une augmentation significative de l'acétylation des histones H3, au même titre que l'apprentissage de peur conditionnée. L'utilisation *ex vivo* de TSA ou de NaB augmente également l'amplitude de la PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe. De plus,

l'administration préalable de MK-801, un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA, n'entraîne pas d'augmentation de l'acétylation des histones H3 dans CA1 alors que l'apprentissage est perturbé dans le test de peur conditionnée (Levenson et al. 2004). En ce qui concerne le modèle murin de délétion de *cbp* spécifiquement dans l'hippocampe (Barrett et coll. 2011), l'altération de la mémoire à long terme hippocampo-dépendante est accompagnée d'une abolition de la PLT dans l'aire CA1. Vecsey et collaborateurs, en 2007 ont également étudié la plasticité synaptique dans CA1, plus précisément la E-LTP (« early-LTP » ou LTP précoce), qui ne requiert pas de transcription (Baltaci et al. 2019). Ils montrent que l'application aiguë de TSA sur la tranche d'hippocampe améliore l'amplitude de la E-PLT, en faisant appel à des mécanismes de transcription puisque l'ajout d'un inhibiteur transcriptionnel, l'actinomycine D, bloque cette amélioration. Ainsi, ces résultats démontrent que l'inhibition des HDAC génère une forme de PLT dépendante de la transcription génique. Toutefois, la TSA n'a pas d'effet chez les souris mutée pour CREB ou pour CBP, suggérant à nouveau la nécessité de l'interaction CREB/CBP dans les effets d'un iHDAC sur les mécanismes cellulaires de la mémoire (Vecsey et al. 2007). Concernant les travaux de Chatterjee et collaborateurs en 2018 présentés précédemment, la diminution de l'amplitude de la DLT dans l'aire CA1 dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer est prévenue par le CSP-TTK21, un activateur HAT, au même titre que la dégradation de la mémoire spatiale observée dans ce modèle. De plus et de manière intéressante, cette prévention est associée à une augmentation du nombre d'épines dendritiques dans CA1, suggérant un lien entre épigénétique et épines dendritiques et par extension, le nombre de synapses. Guan et coll. (2009) ont également étudié l'implication de HDAC2 dans les mécanismes de plasticité synaptique dans l'hippocampe : lorsqu'ils utilisent un protocole de déclenchement de la PLT à 2x100Hz, la surexpression de HDAC2 chez la souris conduit à une abolition de la PLT dans CA1, tandis que les tranches issues des souris WT montrent une PLT robuste et stable. En revanche, un protocole 1x100Hz ne déclenche pas de PLT chez les souris WT, mais déclenche une PLT chez les souris qui n'expriment pas HDAC2. A nouveau, ces modifications épigénétiques impactent la morphologie des épines dendritiques. En effet, les souris chez lesquelles HDAC2 est surexprimée montrent une diminution du nombre d'épines dendritiques par rapport aux souris WT, tandis que sa délétion entraîne une augmentation du nombre d'épines dendritiques dans CA1. Ici, le traitement au SAHA chez la souris WT a le même effet que la délétion de *hdac2* : l'amplitude de la PLT et le nombre d'épines dendritiques dans CA1 sont

augmentés sans toutefois avoir d'effet sur le nombre d'épines dendritiques chez les souris HDAC2$^{-/-}$, suggérant un rôle spécifique de HDAC2 dans la synaptogénèse. Pour rappel, la manipulation de HDAC2 (surexpression ou délétion) est associée à des modifications des niveaux d'expression de gènes tels que *creb*, *camkIIα* et *glun2a* et *glun2b*. Ainsi, ces résultats suggèrent que HDAC2 agit comme un répresseur des gènes impliqués dans la plasticité synaptique dans le champ CA1 (Guan et al. 2009). Finalement, la délétion de *hdac4* chez la souris, qui entraîne une perturbation de la mémoire à long terme est associée à une abolition de la PLT dans l'aire CA1 (Kim et al. 2012).

Ainsi, de nombreuses études ont démontré les effets de modulations épigénétiques sur la transcription génique spécifiquement impliquée dans la plasticité synaptique. Au niveau cellulaire, un acteur principal dans le déclenchement de la plasticité synaptique dans l'hippocampe est le récepteur NMDA. De manière intéressante, dans un modèle de culture *in vitro* de neurones d'hippocampe, la stimulation du récepteur NMDA s'accompagne notamment d'une augmentation de l'acétylation de H3K9 et H3K14 au niveau du promoteur de *bdnf* (Tian et al. 2009). De plus, Guan et coll. (2009) montrent que la surexpression de HDAC2 entraîne la diminution de l'expression de GluN2A et de GluN2B. De façon similaire, Fujita et collaborateurs, en 2012, montrent que le SAHA améliore à la fois la mémoire à long terme dans un test de peur conditionnée, mais aussi l'extinction de ce comportement, associé à une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe. Plus encore, le SAHA augmente l'expression de GluN2B et le niveau d'acétylation au niveau du promoteur du gène *glun2b* est plus important chez les rats traités au SAHA, par rapport aux contrôles (Fujita et al. 2012). **Ces résultats sur les sous-unités du récepteur NMDA nous intéressent particulièrement puisque ce récepteur est connu comme étant l'une des cibles privilégiées de l'éthanol (Lovinger et al. 1989), mais également dans la mesure où nous avons précédemment montré au sein du laboratoire une altération de la plasticité synaptique associée à une modulation du rôle de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA suite à une exposition de type *binge drinking* chez le rat adolescent (Silvestre de Ferron et al. 2015).**

4- Rôle de l'épigénétique dans les TUA

Les données précédentes indiquent que l'épigénétique module de façon importante les processus de mémorisation et en particulier la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA. Considérant que ce dernier est une des cibles importantes de l'éthanol, il est nécessaire de savoir si l'épigénétique intervient dans les TUA.

a) Modèles cellulaires d'exposition à l'éthanol

L'implication de mécanismes épigénétiques dans le champ de l'étude des effets de l'éthanol a été mesurée sur des modèles de culture cellulaire. Agudelo et collaborateurs, en 2011, utilisent des cellules neuronales humaines en culture qu'ils soumettent à plusieurs concentrations d'éthanol (10 à 40mM) pendant 4h, 24h ou 48h et montrent que l'éthanol augmente l'expression génique de HDAC2 de manière dose-dépendante, un effet inhibé par la TSA (Agudelo et al. 2011). Toutefois, une exposition intermittente à des concentrations d'éthanol plus élevées et sur une durée plus importante (EtOH 14h par jour pendant 5 jours à 75 mM) sur des neurones corticaux murins en culture entraîne une augmentation spécifique de l'acétylation de H3K9 et une diminution de la méthylation de H3K9 au niveau du promoteur du gène *glun2b* après 2 jours de sevrage. Egalement, l'exposition à l'éthanol induit une diminution de HDAC1 et 3 au niveau du promoteur de *glun2b* dès la fin de l'exposition, tandis qu'une diminution de HDAC2 n'est observée qu'à partir de 2 jours de sevrage. En revanche, aucun changement dans l'activité HAT ou HDAC globale n'est rapporté (Qiang et al. 2011).

b) Effets de l'éthanol sur l'épigénétique dans les modèles animaux

L'implication de mécanismes épigénétiques dans les effets de l'éthanol a été majoritairement mesurée chez le rongeur (Table 8). Les travaux de Pandey et collaborateurs, en 2008, montrent que dans un paradigme d'alcoolisation chronique chez le rat adulte (diète liquide, EtOH 9%, 15-16 jours), les niveaux d'anxiété et l'activité HDAC sont inchangés à la fin de l'exposition. En revanche, suite à un sevrage de 24h, l'activité HDAC est augmentée et le niveau d'acétylation de H3K9 et H4K8 et CBP sont diminués dans l'amygdale des rats, associé à une hyperanxiété et l'administration de TSA 2h avant la mesure corrige l'augmentation de l'activité HDAC, la diminution de l'acétylation de H3K9 et H4K8 et l'hyperanxiété. Toutefois, la diminution de CBP n'est pas corrigée par la TSA dans l'amygdale (Pandey et al. 2008). Ces résultats suggèrent que l'éthanol entraîne des neuroadaptations au travers de mécanismes épigénétiques qui vont médier l'expression d'un comportement. Plus récemment, en utilisant le même paradigme d'alcoolisation chronique chez le rat adulte, You et collaborateurs montrent en 2014 que les niveaux de BDNF, de Arc et la longueur des épines dendritiques sont diminués dans l'amygdale des rats ayant subi un sevrage de 24h, tandis qu'ils sont inchangés lorsque les animaux sont testés immédiatement après exposition. Comme précédemment, l'administration de TSA 2h avant les tests prévient l'ensemble des effets induits par le sevrage (You et al. 2014). Ainsi, ce résultat indique qu'une exposition chronique à l'éthanol modifie la neuroplasticité dans l'amygdale au travers de mécanismes épigénétiques. Cette fois dans le cortex préfrontal, la consommation volontaire intermittente d'éthanol chez le rat adulte (24h d'accès à l'EtOH suivi de 24h d'accès à l'eau uniquement, répété 17 fois) entraine une augmentation des niveaux de *hdac2* et *hdac3* ainsi qu'une hyperanxiété et ces effets sont corrigés par un traitement par voie systémique à la TSA lors de la session 14 (Bohnsack et al. 2018). Concernant l'hippocampe, suite à un protocole d'alcoolisation en libre choix de 21 jours (éthanolémie maximale 0,5-0,7g/L), *hdac1, 2* et *5* sont significativement diminués dans l'hippocampe, l'acétylation de H4 est augmentée dans le GD et le niveau d'expression de BDNF est augmenté dans le hile et dans CA3 (Stragier et al. 2015). Ainsi, ces régulations épigénétiques au niveau de la synapse dans diverses structures cérébrales participent probablement à l'installation des comportements associés à l'exposition chronique à l'alcool tels que l'anxiété. De manière intéressante, ces atteintes induites par l'éthanol semblent

réversibles par l'utilisation d'iHDAC. Dans ce contexte et dans la mesure où les études précédemment citées s'intéressent aux effets de protocoles d'exposition à l'éthanol relativement longs, il est intéressant de s'interroger sur le moment auquel apparaissent de ces modulations épigénétiques. Les travaux de Pandey et collaborateurs, en 2008, montrent qu'une administration unique d'éthanol (1g/kg ; i.p.) chez le rat adulte induit 1h plus tard une diminution de l'activité HDAC, une augmentation de l'acétylation des histones H3K9 et H4K8 et une augmentation de CBP dans l'amydgale - structure cérébrale impliquée dans les émotions –associé à une hypoanxiété (Pandey et al. 2008). Suivant la même idée, les travaux de Caputi et collaborateurs, en 2015, montrent chez la souris les effets d'une exposition aiguë à l'éthanol (2g/kg ; i.p.) sur les HDAC de classe I dans le striatum et le cortex préfrontal, deux structures cérébrales impliquées dans les addictions aux drogues. Ici, la souris exposée à l'éthanol montre des niveaux nucléaires de HDAC1, 2 et 3 significativement réduits dans le striatum, 1h après le traitement. Concernant le cortex préfrontal, les souris traitées à l'éthanol montrent des niveaux de HDAC3 nucléaire diminués (Caputi et al. 2015). De manière intéressante, l'ensemble de ces résultats montre que des modifications épigénétiques notables sont également déclenchées lors d'expositions aigües à l'éthanol chez le rongeur à l'âge adulte. D'ailleurs, une différence apparait entre les expositions aiguës, où une augmentation de l'acétylation et une diminution des HDAC sont rapportés, et les expositions chroniques qui entrainent généralement l'effet inverse, dans les mêmes structures cérébrales.

Il est important de noter que l'ensemble des résultats présentés précédemment concerne des animaux adultes. Chez le rongeur juvénile/adolescent, dans un paradigme d'alcoolisation au cours duquel les ratons sont exposés à des vapeurs d'éthanol 4h par jour entre P2 et P12 (éthanolémie entre 1,84g/L et 3,2g/L), les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 ainsi que l'expression de CBP sont significativement diminués dans le cervelet par rapport aux animaux contrôles (Guo et al. 2011). D'autre part, dans un modèle d'exposition postnatale à l'éthanol dans lequel les souriceaux (P7) reçoivent deux injections d'éthanol (1g/kg, i.p.) à 2h d'intervalle, les niveaux d'expression des protéines HDAC1, 2 et 3 sont augmentés dans l'hippocampe et le néocortex 8h après la première injection d'éthanol, et cette augmentation persiste jusqu'à 24h. En ce qui concerne l'acétylation des histones, H3K14 et H4K8 sont tous deux diminués dans l'hippocampe et le néocortex. Ce même protocole a été répété sur un autre groupe d'animaux en utilisant des doses plus importantes d'éthanol

(2.5g/kg). De façon semblable, les niveaux de HDAC1 et 2 sont augmentés après 8h dans l'hippocampe et persistent après 24h. Le niveau d'HDAC3 est augmenté dans l'hippocampe à partir de 4h et persiste jusqu'à 24h après la première injection d'éthanol. Concernant le néocortex, les niveaux de HDAC1 et 2 sont augmentés dès 4h, et le niveau d'HDAC3 est augmenté dès 8h ; tous persistent 24h après la première injection. Le niveau d'acétylation de H3K14 est diminué dans l'hippocampe et le néocortex, toutefois l'expression de H4K8 diminue à 4 et 8h post-injection puis augmente 24h après la première injection d'éthanol dans l'hippocampe et le néocortex. De façon intéressante, ces souriceaux traités à l'éthanol montrent des déficits cognitifs à l'âge adulte (P90) et ces effets sont prévenus par l'administration de TSA 30 minutes avant la première injection d'éthanol. L'amplitude de la PLT à l'âge adulte est également réduite dans l'aire CA1 par rapport aux contrôles et cet effet est de nouveau prévenu par la TSA (Shivakumar et al. 2020). Cette étude suggère donc qu'une exposition précoce à l'éthanol induit des modifications épigénétiques persistantes (+24h) et qui sont responsables à long terme, chez l'adulte, de déficits comportementaux et cellulaires sur le plan de la mémoire. Cependant, les études que j'ai citées correspondent à une exposition à l'alcool pendant l'équivalent du troisième trimestre de gestation chez la femme. La question reste de savoir si une exposition à une autre période du développement cérébral, comme lors de l'adolescence, entraine des répercussions sur l'épigénétique et la mémoire similaires ou différentes de celles répertoriées ci-dessus. Ainsi, les travaux de Sakharkar et collaborateurs en 2016 montrent que suite à une exposition intermittente à l'éthanol chez le rat adolescent (EtOH 2g/kg ; i.p. ; une injection d'EtOH par jour, deux jours consécutifs suivis de deux jours sans injections, pour un total de 8 injections, de J28 à J41), l'activité HDAC nucléaire est augmentée dans l'hippocampe des rats à l'âge adulte (P92). Les protéines CBP, BDNF et H3K9 acétylé sont également diminuées dans l'hippocampe et les animaux montrent des signes d'anxiété. De façon intéressante, la neurogenèse dans l'hippocampe est inhibée à l'âge adulte suite à une exposition à l'éthanol pendant l'adolescence et un traitement à la TSA (3 jours consécutifs à l'âge adulte) corrige cet effet (Sakharkar et al. 2016). D'autre part, les travaux de Pascual et collaborateurs en 2012 montrent que suite à une exposition intermittente à l'éthanol chez le rat adulte (EtOH 3g/kg ; i.p. ; une injection d'éthanol par jour, deux jours consécutifs suivis de deux jours sans injections, répété pour un total final de 8 injections, de J30 à J43) augmente l'activité HAT globale et l'acétylation de H3K4 au niveau des promoteurs des gènes *c-Fos* et *bdnf* ,dans le cortex préfrontal, tandis que le même

paradigme d'exposition à l'éthanol chez le rat adulte (âgé de 3 mois) n'induit pas ces effets. L'activité HDAC globale est inchangée dans chaque condition, mais l'administration de NaB 20 minutes avant chaque injection d'éthanol augmente les niveaux d'acétylation de H3K4 au niveau des promoteurs de *c-Fos* et de *bdnf* chez les adolescents par rapport aux animaux ayant reçu l'éthanol seul (Pascual et al. 2012). Ici, le NaB potentialise les effets de l'éthanol dans le cortex préfrontal en augmentant le niveau d'acétylation. De façon intéressante, cette étude montre qu'une exposition intermittente à l'éthanol chez le rat adolescent entraîne des modifications épigénétiques qui ne sont pas retrouvées lors d'une exposition à l'âge adulte, suggérant que l'adolescent est plus vulnérable que l'adulte aux effets de l'éthanol sur le remodelage de la chromatine. Plus récemment, la même équipe a repris ce paradigme d'exposition intermittente à l'éthanol lors de l'adolescence chez la souris. Lorsque les souris sont sacrifiées 24h après la dernière administration d'éthanol, elles présentent une augmentation de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA, de l'acétylation de H3K9, H4K5 et H4K12, de la forme phosphorylée de CREB et de BDNF dans le cortex préfrontal. Lorsque les souris sont sacrifiées 3 semaines après la dernière exposition à l'éthanol, elles présentent une augmentation de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA et de l'acétylation de H4K5, et l'augmentation de CD11b persiste dans le cortex préfrontal. De manière intéressante, l'ensemble de ces effets n'est pas retrouvé chez des souris pour lesquelles le gène codant pour la protéine TLR4 (Toll-like receptor 4) - un récepteur membranaire des neurones et de la glie, médiateur de l'inflammation - est délété et soumises au même paradigme d'exposition à l'éthanol pendant l'adolescence (Montesinos et al. 2016).

L'ensemble de ces résultats souligne les effets délétères à long terme d'une exposition à l'éthanol pendant le développement cérébral, et les discordances entre les résultats peuvent s'expliquer par la différence entre les structures cérébrales étudiées. Toutefois, l'étude de Montesinos coll. (2016) ouvre des perspectives intéressantes au regard des effets d'une exposition intermittente de type *binge drinking* durant l'adolescence en suggérant une interrelation entre mécanismes épigénétiques et mécanismes neuroinflammatoires déclenchés par les expositions répétées à l'éthanol. Dans ce contexte, le chapitre suivant introduit la notion de neuroinflammation à laquelle nous nous sommes aussi intéressés pendant ces travaux de thèse.

	Protocole	Age	Structure cérébrale	Effet moléculaire	Effet comportemental	Référence
CHRONIQUE	EtOH 9% dans la nourriture, 15-16 jours + **24h sevrage**	Adulte	Amygdale	↗ activité HDAC ↘ acH3K9, acH4K8, CBP	Hyperanxiété	*Pandey et al., 2008*
				↘ BDNF, Arc ↘ longueur épines dendritiques		*You et al., 2014*
	EtOH 10% libre choix 21 jours	Adulte	Hippocampe	↘ *hdac1*, *2* et *5* ↗ acH4 et BDNF		*Stragier et al., 2015*
	EtOH 20% libre choix intermittent (1j/2) Répété 17 fois	Adulte	Cortex préfrontal	↗ *hdac1*, *2*, $GABA_A$ α1	Hyperanxiété	*Bohnsack et al., 2018*
	EtOH inhalation, 4h/jour	P2 à P12	Cervelet	↘ acH3, acH4, CBP		*Guo et al., 2011*
	EtOH 2g/kg i.p., 2 jours consécutifs puis 2 jours sans, total de 8 injections	J28 à J41	hippocampe	P92 : ↗ activité HDAC nucléaire ; ↘ CBP, BDNF, acH3K9 ; ↘ neurogénèse	Hyperanxiété	*Sakharkar et al., 2016*
	EtOH 3g/kg i.p., 2 jours consécutifs puis 2 jours sans, total de 8 injections	J30 à J43	Cortex préfrontal	↗ activité HAT globale ↗ acH3K4 sur *c-Fos* et *bdnf*		*Pascual et al., 2012*
				↗ GluN1, GluR1, acH3K9, acH4K5, acH4K12, p-CREB, BDNF, CD11b		*Montesinos et al., 2016*
AIGU	EtOH 1g/kg i.p.	Adulte	Amygdale	↘ activité HDAC ↗ acH3K9, acH4K8, CBP	Hypoanxiété	*Pandey et al., 2008*
	EtOH 2g/kg i.p.	Adulte	Striatum	↘ HDAC 1, 2 et 3 nucléaires		*Caputi et al., 2015*
			Cortex préfrontal	↘ HDAC3 nucléaire		
	2xEtOH 1g/kg i.p., intervalle 2h	P7	Hippocampe Néocortex	↗ HDAC1, 2 et 3 ↘ acH3K14, acH4K8 ↘ PLT		*Shivakumar et al., 2020*
	2xEtOH 2,5g/kg i.p., intervalle 2h				Age adulte : déficits cognitifs	

Table 8 : Les effets d'une exposition à l'éthanol sur les mécanismes épigénétiques de type acétylation/désacétylation.

Chapitre IV

Les processus de neuroinflammation

1- Généralités

L'inflammation est un processus biologique qui intervient en réponse à une lésion, une infection ou un traumatisme subi par les tissus ou les cellules dans le but d'initier la réparation tissulaire/cellulaire, l'angiogenèse ou d'éliminer des agents pathogènes (Carson et al. 2006) afin d'assurer le maintien de l'intégrité de l'organisme. Les déclencheurs de l'inflammation peuvent être aseptiques, tels qu'un acte de chirurgie stérile au cours duquel des tissus vont être lésés ; ou non-aseptiques, tels qu'une invasion bactérienne ou virale. La réponse inflammatoire constitue la base de l'immunité innée – la première ligne de défense de l'organisme, qui intervient lorsque l'hôte n'a pas encore rencontré le pathogène – alors que la réponse immunitaire, constitue la base de l'immunité acquise. La réponse inflammatoire est orchestrée par différents types cellulaires et différentes molécules de signalisation qui produisent une réponse qui est à la fois locale et systémique. L'inflammation engage notamment les leucocytes, les cellules endothéliales et des molécules de signalisation telles que le monoxyde d'azote, les prostaglandines et les cytokines (Lyman et al. 2014). Dans le contexte d'une invasion de pathogènes, les leucocytes qui résident dans les tissus vont reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (les *PAMPs, pathogen-associated molecular patterns*) présents à la surface de l'agent pathogène grâce à la présence de récepteurs de reconnaissance de motifs (*PRR, pattern recognition receptor*). Les leucocytes déjà présents dans les tissus stimulent les cellules endothéliales qui présentent des molécules d'adhérence cellulaire, qui, à leur tour, vont permettre l'adhésion d'autres leucocytes à l'endothélium lésé. Les monocytes vont alors se différencier en macrophages, capables de phagocytose et de sécréter des molécules de signalisation telles que les cytokines pro-inflammatoires (présentées Table 9). Ces dernières vont permettre le recrutement de cellules circulantes ainsi que l'élimination du pathogène. La seconde étape de la réponse immunitaire

est la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire, généralement médiée par des molécules de signalisation telles que les cytokines anti-inflammatoires (présentées Table 9). Les cytokines jouent un rôle clé dans l'inflammation puisque qu'elles induisent, contrôlent ou inhibent la réponse immunitaire en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques et en exerçant des fonctions autocrine, paracrine et plus rarement endocrine. Dans le cadre d'une lésion tissulaire, les cellules lésées présentent cette fois des motifs moléculaires associés au dommage (*DAMPs, damage associated molecular patterns*) qui seront également reconnus par les *PPR* présents à la surface des cellules immunitaires. L'inflammation est un processus initialement bénéfique, toutefois un échec dans la résolution de l'agression initiale ou une réponse inflammatoire inadaptée peuvent entraîner une inflammation chronique, et ainsi conduire à une mauvaise réparation des tissus, voire à une cytodestruction (Carson et al. 2006).

Cytokines pro-inflammatoires	**Abbréviation**
Facteur de Nécrose Tumorale (*Tumor Necrosis Factor*) α	TNF-α
Interféron α, β	IFN- α, IFN-β
Interleukine 1β, 6, 12, 18	IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18
Cytokines anti-inflammatoires	**Abbréviation**
Facteur de Croissance Transformant (Transforming Growth Factor) β	TGF-β
Interleukine 4, 10	IL-4, IL-10

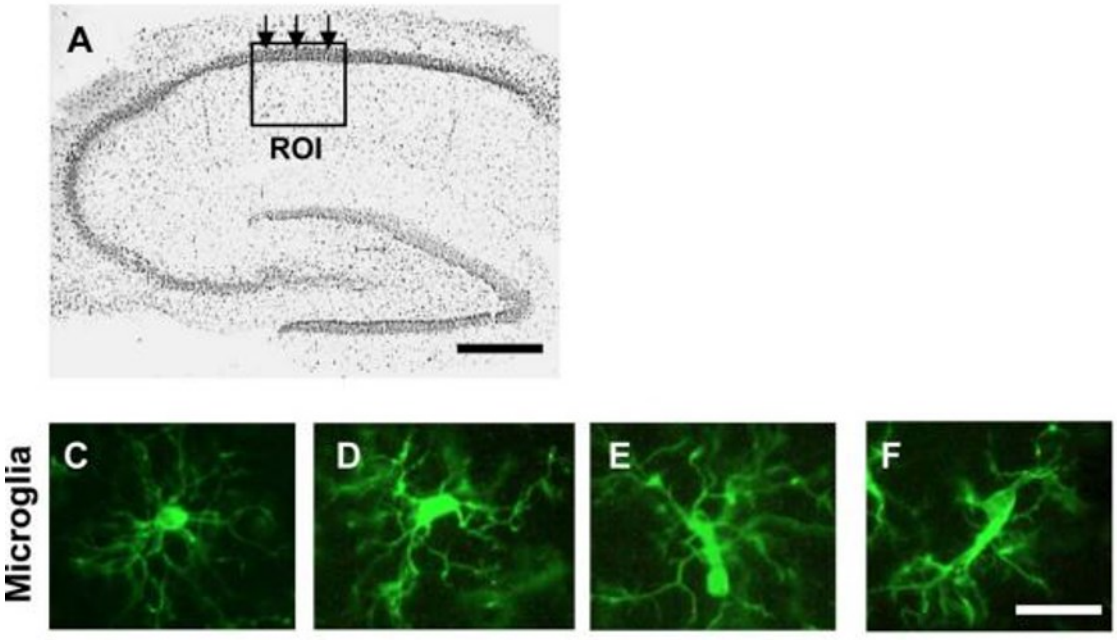
Table 9 : Les principales cytokines pro- et anti-inflammatoires et leurs abréviations.

On a longtemps pensé que les cytokines étaient de trop grosses protéines pour traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), et que le SNC était dépourvu de cellules immunitaires. Cependant, des études ont montré que des cytokines telles que TNF-α et IL-1β affectent l'intégrité de la BHE, la rendant plus perméable et de fait, permettent aux leucocytes d'accéder au SNC (Laflamme et al. 1999; Terrando et al. 2011). Il a été montré que le cerveau

possèdait également ses propres cellules immunitaires, capables de déclencher une réponse inflammatoire : on parle alors de neuroinflammation. En effet, le SNC regroupe les neurones et les cellules gliales. La glie regroupe les oligodendrocytes, impliqués dans la myélinisation des axones ; la glie radiaire, qui correspond aux cellules précurseurs du SNC ; la microglie et les astrocytes, auxquels nous porterons un intérêt particulier, sont impliqués dans le processus de neuroinflammation.

Les **cellules microgliales (microglie)** proviennent du sac vitellin et entrent dans le SNC durant l'embryogénèse, à J8,5 (Ginhoux et al. 2010). Elles représentent 5 à 15% des cellules du SNC et sont les macrophages résidants du cerveau. La microglie assure le maintien de l'homéostasie et contribue au bon fonctionnement du SNC, par des mécanismes tels que l'ajustement des circuits neuronaux (synaptogénèse, élagage synaptique) et la phagocytose de débris apoptotiques. La microglie constitue la première ligne de défense du SNC, c'est elle qui participe le plus activement à la réponse inflammatoire. Tandis que les corps cellulaires microgliaux restent statiques, leurs prolongements « scannent » en continu l'espace environnant et communiquent directement avec les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins. C'est ce criblage constant de l'environnement qui permet aux microglies de répondre rapidement à un dommage ou à une infection. Dans le cadre d'une infection ou d'une maladie, la microglie « s'active » et passe rapidement d'une forme ramifiée à une forme circulaire : c'est la réactivité microgliale (Figure 13). La microglie activée fonctionne alors comme un médiateur cellulaire de l'inflammation. En effet, en modifiant son phénotype, elle altère rapidement son profil transcriptionnel et produit des cytokines et chimiokines inflammatoires. De plus, l'activation de la microglie entraîne des réarrangements de son cytosquelette, ce qui modifie le profil d'expression des récepteurs à sa surface. Ce nouveau profil d'expression de récepteurs permet à la microglie de migrer vers les sites de blessure/infection et d'augmenter son efficacité de phagocytose. Ainsi, ce sont les cellules microgliales, par leur rapidité d'activation et leur mobilité importante, qui initient le processus de neuroinflammation (DiSabato et al. 2016; Yang and Zhou 2019). En fonction du milieu dans lequel elle est activée ou des facteurs qui la stimulent, la microglie présente deux phénotypes possibles qui sont les phénotypes M1 et M2. Le phénotype M1 est classiquement associé avec la cytotoxicité et la réponse inflammatoire, et il est induit par la présence de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1β et TNF-α, libérées par les pathogènes ou les cellules lésées. La

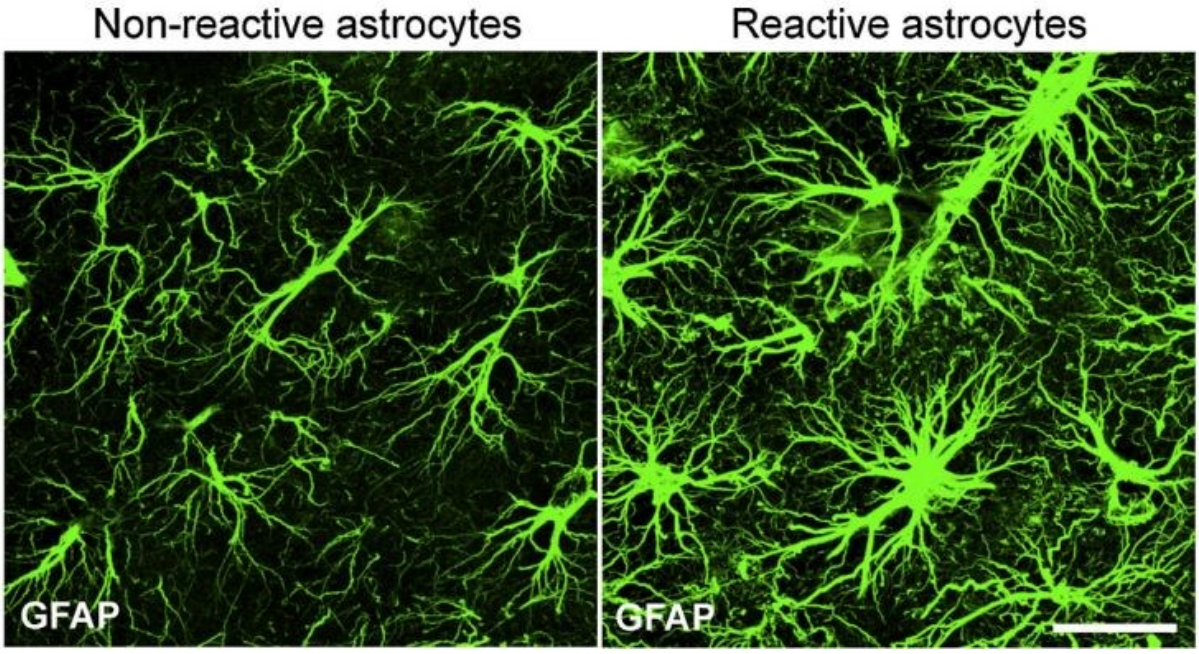
microglie orientée vers le phénotype M1 va à son tour sécréter des substances (dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species,* ROS), monoxyde d'azote, cytokines pro-inflammatoires, prostaglandines, protéases…) qui vont favoriser l'orientation phénotypique d'autres microglies. *In fine*, le phénotype M1 permet la destruction du pathogène par la restriction du fer, l'acidification du phagosome et la sécrétion de ROS. Le phénotype M2 est induit par la présence de cytokines anti-inflammatoires entraine la libération, entre autres, de la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10), de l'Arginase-1 et de facteurs pro-fibrotiques comme la fibronectine permettant la réparation et la régénération tissulaire. Ce phénotype est également associé à la mémoire de la réponse immunitaire. En général, suite à une infection, c'est d'abord le phénotype M1 qui domine dans le but de défendre le tissu et d'éliminer le pathogène, puis le phénotype M2 prend le relais pour réparer les tissus et favoriser un retour à l'homéostasie. De façon générale, l'activation microgliale permet la protection du SNC. En revanche, une activation microgliale exagérée ou prolongée peut entrainer des changements pathologiques et des conséquences négatives. Une telle activation a été rapportée dans la dépression et certaines perturbations cognitives (Chhor et al. 2013; Loane and Kumar 2016; Tang and Le 2016; DiSabato et al. 2016; Allen and Lyons 2018; Wang et al. 2019; Kwon and Koh 2020).



<u>Figure 13</u>*:* Exemple de réactivité microgliale dans l'hippocampe de rat par immunofluorescence. (A) Localisation de la région d'intérêt dans l'hippocampe. (C) Microglie au repos avec une forme hautement ramifiée et un corps cellulaire petit et rond. (D-F)

Microglies activées avec un grand corps cellulaire et peu de ramifications. Barre d'échelle : 20µm.
Illustration et légende adaptée de (Cerbai et al. 2012)

Les **astrocytes** sont les cellules les plus abondantes du SNC puisqu'ils représentent 35% des cellules. Ce sont des cellules en forme d'étoile dont les ramifications se divisent jusqu'à des prolongements très fins qui interagissent étroitement avec les autres cellules du SNC et les vaisseaux capillaires. Les astrocytes régulent le flux sanguin local et les échanges en ions et en eau pour maintenir l'homéostasie (Sofroniew and Vinters 2010) et fournissent un support métabolique aux neurones par la libération de glucose et de lactate, notamment lorsque le neurone est activé de façon prolongée (Pellerin et al. 2007). Initialement considérés comme un soutien inerte nécessaire au fonctionnement des neurones, son implication dans la communication interneuronale a été mise en évidence par la présence de transporteurs des acides aminés excitateurs (*excitatory amino acid transporters*, EAAT) 1 et 2 qui transportent le glutamate et influencent la transmission synaptique et par sa capacité de libération de gliotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA (Danbolt 2001; Volterra and Meldolesi 2005). L'astrocyte régule également le nombre, la taille et la forme des épines dendritiques (Murai et al. 2003), lui conférant un rôle critique dans le remodelage synaptique, lui-même impliqué dans les processus cognitifs (Harris and Kater 1994). Pour finir, l'astrocyte est capable de répondre de façon graduée à une perturbation : on parle de réactivité astrocytaire ou astrogliose. En effet, tout comme la microglie, l'astrocyte présente à sa surface des récepteurs de l'inflammation et est capable de sécréter – entre autres - des cytokines et des prostaglandines (Sofroniew 2009) (Figure 14).



<u>Figure 14</u> : Exemple de réactivité astrocytaire dans le gyrus denté chez la souris, par immunofluorescence. A gauche : astrocytes non réactifs. A droite : Astrocytes présentant une hypertrophie des prolongements, traduisant une astrogliose. Barre d'échelle : 25µm. Illustration issue de (Pekny et al. 2014)

Tout comme les leucocytes lors d'une inflammation périphérique, la microglie et les astrocytes présentent à leur surface des *PRR* qui vont reconnaître des *PAMPs* et des *DAMPs*. Parmi les *PRR*, la famille des *Toll-like receptors* (TLR) est extrêmement exprimée sur les cellules de l'immunité innée. Chaque TLR va reconnaître différents *PAMPs* ou *DAMPs* : par exemple, TLR2 reconnaît des *PAMPs* issus de bactéries, de virus, de champignons ou de parasites, tandis que TLR4 est plutôt activé par l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) présent sur les bactéries à gram négatif et par des DAMPs endogènes tels que le *high-mobility group box-1* (HMGB-1), libéré par les tissus endommagés. Au total, 10 TLRs (1 à 10) ont été identifiés chez l'humain, 12 TLRs (1 à 9 et 11 à 13) ont été identifiés chez le rongeur et la microglie exprime presque tous les types de TLR, mais plus particulièrement TLR2 et TLR4. Les astrocytes expriment également les TLR mais à un niveau plus bas, excepté pour TLR3 qui est plus exprimé sur les astrocytes que sur la microglie. Outre les cellules gliales, les neurones expriment également une variété de TLRs, et notamment le TLR4 (Tang et al. 2007; Kumar 2019). Une fois le ligand fixé sur le TLR, la cellule contribue à la phase aiguë de l'inflammation en sécrétant des

cytokines, des prostaglandines, des chimiokines et des ROS (Farina et al. 2007; Yang and Zhou 2019).

Plusieurs études ont montré l'implication de la neuroinflammation dans divers processus et notamment la neurogénèse, où l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires diminue la prolifération des cellules souches neurales de l'hippocampe et notamment au niveau de la zone sub-granulaire du GD (Ben-Hur et al. 2003; Koo and Duman 2008). L'implication de processus neuroinflammatoires a également été rapportée dans diverses pathologies et notamment la sclérose en plaque (Bhargava et al. 2020), la dépression (Kim et al. 2016), les maladies neurodégénératives (Chen et al. 2016) mais également les TUA (Crews et al. 2017). Dans le contexte de nos études, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'implication de la neuroinflammation dans les perturbations cognitives induites par l'éthanol.

2- Neuroinflammation, mémoire et plasticité synaptique

La mise en évidence de l'existence de cellules immunitaires au sein du SNC et leur interaction avec les neurones a conduit la communauté scientifique à s'intéresser au rôle des médiateurs de l'inflammation dans l'apprentissage et la mémoire hippocampo-dépendante. Un intérêt particulier a été porté aux cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, le TNF-α, et l'IL-6, ainsi qu'aux prostaglandines. Dans cette partie, nous allons préciser les effets de ces médiateurs de l'inflammation sur les processus mnésiques et leurs corrélats cellulaires.

L'IL-1β

Il existe deux isoformes de l'IL-1 : l'IL-1α et l'IL-1β, et deux récepteurs : l'IL-1R1 et l'IL-1R2. Dans la mesure où l'IL-1α est essentiellement présent dans le compartiment intracellulaire, nous nous intéresserons à l'IL-1β qui est capable de passer dans le milieu extracellulaire et ainsi, exercer son effet sur les cellules voisines. Chez des souris déficientes

pour l'IL-1R, la mémoire dans un test de piscine de Morris et dans un paradigme de peur conditionnée est pertubée (Avital et al. 2003). D'ailleurs, l'expression génique de l'IL-1β est augmentée dans l'hippocampe de souris 24h après un paradigme de peur conditionnée (Goshen et al. 2007) et dans l'alternance spontanée (Labrousse et al. 2009). Ces résultats suggèrent un rôle crucial de la sécrétion physiologique de l'IL-1β lors d'un processus cognitif. Chez le rat adulte et sans modification génétique, bloquer pharmacologiquement le récepteur IL-1 par l'administration i.c.v. d'IL-1ra, son antagoniste, perturbe la mémoire spatiale à court terme, testée 24h après un test de piscine de Morris ainsi que la mémoire à long terme mesurée 8 jours après injection dans un test d'évitement passif (Yirmiya et al. 2002). Ceci est en adéquation avec les résultats obtenus à partir de modèles transgéniques et l'ensemble souligne le rôle physiologique de l'IL-1β dans la formation de la mémoire hippocampo-dépendante. En revanche, moduler le niveau d'expression d'IL-1β n'est pas sans conséquences sur les processus cognitifs. En effet, une faible dose d'IL-1β (10ng) administrée par voie i.c.v. chez le rat suffit à perturber la mémorisation dans un paradigme de peur conditionnée lié au contexte après 48h, alors que la mémoire de peur conditionnée liée à un indice auditif demeure inchangée (Pugh et al. 1999), suggérant que l'hippocampe est particulièrement affecté. En revanche, dans les travaux de Yirmiya et coll., une faible dose d'IL-1β (10ng/rat, i.c.v.) n'a aucun effet sur la mémoire spatiale mais améliore la performance des rats dans un test d'évitement passif, 5 jours après l'injection (Yirmiya et al. 2002), alors que Oitzl et collaborateurs avaient rapporté en 1993 une perturbation de la mémoire spatiale suite à l'administration i.c.v. d'IL-1β chez le rat (Oitzl et al. 1993). Cette divergence entre les résultats sur la mémoire spatiale peut s'expliquer par une différence de dose. En effet, dans les travaux de Oitzl et coll., la dose d'IL-1β (i.c.v.) est 10 fois supérieure à celle utilisée par Yirmiya et coll. Ceci suggère un effet dose-dépendant de l'IL-1β sur la mémoire : lorsque l'IL-1β est absente ou lorsqu'elle est présente en trop grande quantité, la mémoire hippocampo-dépendante est perturbée alors que sa présence en faible concentration joue un rôle à la fois bénéfique et indispensable dans formation de la mémoire. Il est important de souligner également que l'élévation du niveau d'IL-1β impacte plus ou moins la mémoire en fonction du test utilisé. De ce fait, nous pouvons nous poser la question de savoir s'il existe une différence de sensibilité à l'IL-1β en fonction de la tâche réalisée ?

Parmi les études qui s'intéressent au rôle de l'IL-1β dans les processus mnésiques, seuls Avital et coll. ont accompagné leurs résultats comportementaux de résultats électrophysiologiques. Ils montrent que les perturbations mnésiques des souris déficientes pour l'IL-1R s'accompagnent d'une abolition de la PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe, *ex vivo* (Avital et al. 2003), suggérant un rôle clé de l'IL-1 dans le déclenchement de la PLT. En effet, les travaux précédents de Schneider et collaborateurs montrent que le niveau d'ARNm de l'IL-1β chez le rat augmente pendant la PLT déclenchée *ex vivo* dans CA1 (Schneider et al. 1998), suggérant un rôle physiologique de l'IL-1β dans la PLT. Si la présence physiologique d'IL-1β est cruciale au maintien de la PLT, les travaux de Bellinger et collaborateurs, en 1993, sont les premiers à montrer que l'application *ex vivo* d'IL-1β diminue de manière dose-dépendante l'amplitude de la PLT enregistrée en somatique et en dendritique dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Bellinger et al. 1993), un effet confirmé chez la souris (Ross et al. 2003) et le rat dans le GD (Cunningham et al. 1996; Murray and Lynch 1998; Loscher et al. 2003). De plus, et de façon intéressante, les travaux de Coogan et collaborateurs montrent que l'application *ex vivo* d'indométhacine, un inhibiteur des COX, prévient l'inhibition de la PLT induite par l'IL-1β dans le GD chez le rat (Coogan et al. 1999) et l'administration i.c.v. de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 prévient l'effet inhibiteur de l'IL-1β sur la PLT *in vivo*, toujours dans le GD (Kelly et al. 2001). Toutefois, cet effet inhibiteur de l'IL-1β a été remis en cause dans les travaux plus récents de Nisticò et collaborateurs, en 2013. En effet, ces derniers montrent que l'application *ex vivo* d'IL-1β augmente la PLT dans CA1 chez la souris, alors que la DLT est abolie (Nisticò et al. 2013). Cette différence d'effet sur la PLT pourrait provenir de la dose, puisque l'ensemble des études citées précédemment et qui appliquent l'IL-1β *in vitro* l'utilisent entre 1 et 10ng/mL, tandis que Nisticò et coll. utilisent une dose de 30ng/mL. En revanche, l'effet inhibiteur de l'IL-1β sur la DLT est en accord avec les travaux antérieurs de Ikegaya et collaborateurs (Ikegaya et al. 2003). Les résultats de Nisticò et coll. nous intéressent particulièrement dans la mesure où il a été rapporté que l'IL-1β induit le même effet sur la PLT et la DLT que les résultats que nous avons obtenus 48h après deux épisodes d'intoxication éthylique chez le rat adolescent (Silvestre de Ferron et al. 2015). Toutefois, on regrette l'absence de tests comportementaux évaluant les capacités mnésiques des animaux dans les travaux de Nisticò et coll., qui auraient pu apporter des informations quant aux effets d'une abolition de la DLT concomitante à une augmentation de la PLT sur les processus cognitifs hippocampo-dépendants. Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'effet de l'IL-1β sur la

plasticité synaptique, les travaux de Viviani et collaborateurs en 2003 dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe ont montré que l'IL-1β activait des tyrosines kinases de la famille Src qui entrainent la phosphorylation des sous-unités GluN2A et GluN2B du récepteur NMDA, améliorant ainsi la conductance calcique du récepteur NMDA (Viviani et al. 2003). Ce résultat a été confirmé à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques effectués avec la méthode de « patch clamp », où un traitement à l'IL-1β augmente l'amplitude des courants NMDA de façon dose-dépendante (Yang et al. 2005).

Le TNF-α

Le TNF-α, transmembranaire, diffuse dans le milieu extracellulaire suite à un clivage par une métalloprotéinase. Il se fixe sur deux récepteurs : le TNF-R1 et le TNF-R2. Les travaux de Baune et collaborateurs en 2008 montrent que la mémoire est perturbée dans un test de reconnaissance de nouvel objet chez des souris déficientes pour le gène *tnf* (Baune et al. 2008) alors que l'apprentissage spatial est amélioré chez la souris (Golan et al. 2004), bien que cette amélioration ne soit pas retrouvée dans les travaux de Gerber et coll. (Gerber et al. 2004). Ainsi, ces données n'offrent pas de conclusion claire quant au rôle physiologique de TNF-α dans les processus mnésiques. Toutefois, si la présence de TNF-α n'est pas assurément nécessaire dans le bon fonctionnement de la mémoire, le constat est plus clair quand il s'agit de sa surexpression. Fiore et collaborateurs, en 1996 ont montré une perturbation de l'apprentissage dans un test d'évitement passif chez des souris transgéniques adultes chez lesquelles le TNF-α était surexprimé (Fiore et al. 1996). De manière similaire, l'administration i.c.v. de TNF-α chez le rat adulte durant les 7 jours précédant le début d'un paradigme de piscine de Morris montre une perturbation à la fois de l'apprentissage mais également de la rétention de la tâche (Bjugstad et al. 1998). Ainsi, une augmentation du niveau de TNF-α perturbe la mémoire hippocampo-dépendante.

Sur le plan électrophysiologique, tandis qu'une absence de DLT dans CA1 est rapportée chez des souris présentant une délétion du gène codant pour TNF (Albensi and Mattson 2000), une autre étude ne rapporte pas de perturbation de la PLT ou de la DLT dans CA1 chez la souris présentant cette même mutation (Stellwagen and Malenka 2006). *Ex vivo*, plusieurs travaux montrent que le TNF-α exogène inhibe la PLT dans l'aire CA1 et le GD (Tancredi et al. 1992;

Cunningham et al. 1996; Butler et al. 2004). Plus récemment, Maggio et Vlachos ont investigué *ex vivo* l'impact de doses croissantes de TNF-α sur la PLT dans CA1. Alors qu'à très faible dose (0.1ng/mL), le TNF-α n'a pas d'effet sur la PLT, une dose 10 fois plus importante augmente l'amplitude de la PLT. En revanche, l'amplitude de la PLT est diminuée lorsque le TNF-α est appliqué à 1µg/mL (Maggio and Vlachos 2018). Ces travaux sont particulièrement intéressants puisqu'ils démontrent que le TNF-α est capable de moduler le seuil θ de déclenchement de la PLT et soutiennent l'idée que la présence de cytokines pro-inflammatoires en faible concentration participe pleinement aux processus cognitifs dans l'hippocampe. En revanche, le constat reste flou en ce qui concerne la DLT car les études manquent sur ce sujet. Concernant les mécanismes pouvant expliquer comment TNF-α participe à la plasticité synaptique dans l'hippocampe, Beattie et collaborateurs montrent que le TNF-α augmente le nombre de récepteurs AMPA à la surface des neurones hippocampiques en culture et bloquer l'action endogène du TNF-α à un effet négatif sur cette expression (Beattie et al. 2002). Toujours en culture cellulaire, le TNF-α augmente préférentiellement l'expression des récepteurs AMPA dont la sous-unité GluA2 est manquante, c'est-à-dire des récepteurs qui sont perméables au Ca^{2+}, et diminue l'expression des récepteurs $GABA_A$ à la surface des neurones de l'hippocampe (Stellwagen et al. 2005; Pribiag and Stellwagen 2013). Ces résultats soulignent le rôle du TNF-α dans la régulation de l'insertion et du retrait des récepteurs AMPA et $GABA_A$ à la membrane neuronale, alors même que ces récepteurs sont largement impliqués dans la plasticité synaptique. Toutefois, une augmentation pathologique du niveau de cytokine TNF-α pourrait entrainer une excitotoxicité par son action sur les récepteurs AMPA et $GABA_A$ et *in fine* participer aux dommages rapportés dans diverses pathologies.

L'IL-6

Chez des souris déficientes pour l'IL-6, des perturbations mnésiques dans le test de reconnaissance de nouvel objet et de piscine de Morris ont été rapportées (Hryniewicz et al. 2007; Baier et al. 2009), suggérant l'importance de la présence d'IL-6 dans les processus mnésiques hippocampo-dépendants. Alors que l'administration i.c.v. d'IL-6 n'a pas d'effet sur la mémoire spatiale (Oitzl et al. 1993), les travaux plus récents de Ma et Zhu montrent que l'administration i.h. d'IL-6 perturbe la mémoire dans un test d'évitement passif chez le rat adulte (Ma and Zhu 2000). Il a été également observé que l'administration par voie i.p. d'IL-6 en fin de gestation entraine une perturbation de la mémoire spatiale dans le test de piscine

de Morris chez la descendance, à l'âge adulte, ainsi qu'une augmentation du niveau d'ARNm d'IL-6 et de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA dans l'hippocampe (Samuelsson et al. 2006). De façon intéressante, cette étude suggère une implication du récepteur NMDA dans les perturbations mnésiques induites par l'élévation du niveau d'IL-6 dans l'hippocampe. Le bilan est donc relativement simple concernant l'implication de l'IL-6 dans la cognition : un niveau basal d'IL-6 est nécessaire aux processus hippocampo-dépendants alors qu'une élévation de ce niveau est délétère. L'absence d'effet rapporté par Oitzl et coll. peut s'expliquer par le fait que l'IL-6 n'ai été administrée qu'après la phase d'entrainement, et non avant comme dans les autres études. D'ailleurs, cela pourrait suggérer que l'IL-6 est nécessaire dans l'acquisition de la tâche et non dans la rétention de l'apprentissage.

Si l'on s'intéresse au rôle de l'IL-6 dans les processus de plasticité synaptique, une augmentation du niveau d'ARNm pour l'IL-6 a été relevée 4h après l'induction de la PLT *in vivo*, dans CA1, alors qu'il est inchangé après l'induction d'une DLT (Jankowsky et al. 2000). Ce résultat a été confirmé à la fois *in vitro* et *in vivo* et de façon intéressante, neutraliser l'IL-6 endogène 90 min après l'induction de la PLT *in vivo* renforce son amplitude et au niveau comportemental, la rétention d'une tâche d'alternance spatiale dans un labyrinthe en Y est améliorée (Balschun et al. 2004). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'IL-6 contrôle négativement la consolidation de la mémoire spatiale en agissant sur la PLT et confirment le rôle physiologique de l'IL-6 dans les processus cellulaires de la mémoire dans l'hippocampe, bien que ce rôle semble différent des cytokines pro-inflammatoires évoquées précédemment. Toutefois, la PLT est inhibée dans CA1 lorsque les tranches sont incubées avec de l'IL-6 exogène (Li et al. 1997; Tancredi et al. 2000; Stampanoni Bassi et al. 2019) ou dans le GD de souris transgéniques qui surexpriment IL-6 (Bellinger et al. 1995). Parmi les mécanismes pressentis dans les effets de l'IL-6 sur la PLT, il a été proposé une suppression de la production d'IP_3 et ainsi une diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Li et al. 1997). Ainsi, à l'instar des médiateurs de l'inflammation présentés précédemment, une élévation du niveau de cytokine IL-6 perturbe la PLT dans l'hippocampe. En revanche, à ce jour, aucune étude n'a été effectuée sur les effets de l'IL-6 sur la DLT, que ce soit dans l'hippocampe ou au sein d'une autre structure cérébrale.

Les prostaglandines

Les prostaglandines (PG) sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique par des enzymes, les cyclooxygénases (COX), qui existent sous deux isoformes, COX-1 et COX-2, qui sont présentent à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales. Parmi les PG (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2, PGI_2, et le tromboxane A_2 (TXA_2)), la communauté scientifique a mis en évidence un rôle plus spécifique des PGE_2 dans les processus mnésiques. En effet, chez des souris présentant une délétion du récepteur de PGE_2 (EP2), des perturbations cognitives dans les tests d'évitement passif, de reconnaissance sociale et de mémoire spatiale ont été rapportées (Yang et al. 2009; Savonenko et al. 2009). Lorsque l'on s'intéresse aux effets d'une administration de PGE_2 exogène, les travaux de Hein et collaborateurs, en 2007, montrent que l'administration intra-hippocampique de PGE_2 juste après la phase de conditionnement perturbe de façon dose-dépendante la mémoire dans un paradigme de peur conditionnée liée au contexte chez le rat. Egalement et de façon intéressante, l'augmentation de l'expression génique de BDNF dans l'aire CA1 de l'hippocampe dorsal retrouvée après le conditionnement chez les animaux contrôles n'est pas présente chez les animaux ayant reçu la PGE_2, suggérant une interaction entre PGE_2 et BDNF, une protéine largement impliquée dans les processus mnésiques (Hein et al. 2007). Dans la plupart des cas la synthèse de PGE_2 est contrôlée par COX-2 (Kalinski 2012) qui est particulièrement inductible par les médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1β et le TNF-α (Morita 2002). L'influence de COX-2 dans la cognition a également fait l'objet de travaux. Dans la tâche de piscine de Morris, l'apprentissage est perturbé par l'inhibition non sélective des COX avec l'ibuprofène (Shaw et al. 2003) ou en inhibant spécifiquement COX-2 avec le celecoxib (Rall et al. 2003; Tabrizian et al. 2018), au même titre que la mémorisation en inhibant les COX avec l'indométhacine ou spécifiquement COX-2 avec le NS-398. Toutefois et de façon intéressante, inhiber sélectivement COX-1 n'a pas d'effet, suggérant un rôle clé de COX-2 dans la rétention de la mémoire spatiale (Teather et al. 2002). Ainsi, ces études démontrent que PEG2 et COX-2 sont exprimées dans des conditions normales et contribuent au fonctionnement mnésique hippocampo-dépendant, tandis qu'une sous-expression ou une surexpression de ces facteurs semble entrainer des conséquences négatives sur les processus cognitifs.

Parmi les études qui s'intéressent au rôle des prostaglandines dans la cognition, seulement deux d'entre elles ont associé leurs résultats comportementaux à une étude

électrophysiologique. Yang et collaborateurs, en 2009, montrent que l'altération de la mémoire spatiale chez les souris déficientes pour le récepteur de la PGE_2 s'accompagne d'une diminution de la PLT dans le GD (Yang et al. 2009) alors qu'elle n'est pas perturbée dans CA1. En revanche et de façon intéressante, c'est la DLT qui est diminuée dans CA1 (Savonenko et al. 2009). Il s'agit ici d'une des rares études rapportant une abolition de la DLT associée à des perturbations mnésiques. *Ex vivo*, l'inhibition des COX-2 par le NS398 bloque l'induction de la PLT dans GD, et l'application de PGE_2 contrecarre l'effet de l'inhibition pharmacologique de COX-2 (Chen et al. 2002). D'une manière analogue, inhiber COX-2 par l'administration i.p. de celecoxib bloque l'induction de la PLT *ex vivo* dans le GD, un effet prévenu par l'administration i.h. de PGE_2, alors qu'inhiber COX-1 ne perturbe pas la PLT. De plus, les auteurs montrent que le celecoxib bloque la phosphorylation de ERK et l'expression de c-Fos, qui sont des cascades de signalisation associées à l'induction de la PLT (Figure 9) et ces effets sont prévenus par l'administration de PGE_2 (Cowley et al. 2008). Concernant la DLT, elle est abolie dans le GD suite à l'application *ex vivo* de NS398, l'inhibiteur sélectif des COX-2 (Murray and O'Connor 2003). La majorité des études présentées ci-dessus concernent le GD, et on regrette que l'effet physiologique des COX sur la plasticité synaptique n'ai pas été plus amplement étudié dans CA1. L'ensemble de ces résultats souligne toutefois le rôle prépondérant de PGE_2 dans le déclenchement de la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Moduler le niveau d'expression de PGE_2 entraine des conséquences sur la plasticité synaptique qui, *in fine*, se traduisent en perturbations cognitives.

En conclusion, cette revue de la littérature indique que l'ensemble des médiateurs pro-inflammatoires présentés ci-dessus agissent à l'unisson dans le fonctionnement physiologique des mécanismes cellulaires de la mémoire hippocampo-dépendante et que perturber cet équilibre a des répercussions importantes sur les processus cognitifs et leurs mécanismes sous-jacents.

LPS et neuroinflammation

Avant de passer à la prochaine partie et dans la mesure où l'ensemble des études citées précédemment ont été réalisées sur des animaux sains - c'est-à-dire en dehors d'un contexte de pathologie aigüe ou chronique - nous souhaitons aborder les altérations mnésiques en

situation pathologique dans un modèle bien décrit de situation inflammatoire : la réponse au lipopolysaccharide (LPS), composé actif retrouvé dans la membrane externe des bactéries à gram négatif et qui se fixe sur le récepteur TLR4. Ainsi, le LPS est un puissant stimulateur du système immunitaire et son administration en périphérique entraine chez le rongeur tous les changements comportementaux et physiologiques qui interviennent durant un état de maladie (diminution de la consommation de nourriture ou d'eau, de l'exploration et de l'interaction sociale, augmentation du temps de sommeil, fièvre, hyperalgie…). L'administration périphérique de LPS produit tous ces symptômes en induisant la libération de médiateurs de l'inflammation. De façon intéressante, plusieurs études montrent que l'administration de LPS entraine également un état inflammatoire du SNC. En effet, chez des souris adultes, une seule administration i.c.v. de LPS perturbe la mémoire spatiale, augmente les niveaux d'ARNm du marqueur microglial CD11b, du marqueur astrocytaire GFAP, mais aussi de NF-κB, d'IL-1β, de l'IL-6, de TNF-α et réduit la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe (Liu et al. 2018). L'administration de LPS par voie i.p. une fois par jour pendant 7 jours perturbe également la mémoire spatiale chez la souris adulte. Cette perturbation est associée à une perte neuronale, une activation microgliale dans l'hippocampe et une augmentation des niveaux protéiques de TLR4, IL-1β, TNF-α, COX-2 et PGE2 à la fois dans le cerveau et/ou le sérum, alors que les niveaux de cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 sont significativement diminuées. De façon intéressante, traiter les animaux au VIPER, un peptide inhibiteur spécifique de TLR4, 2h avant chacune des administrations de LPS prévient la neuroinflammation et les perturbations mnésiques induites par le LPS (Zhao et al. 2019). L'ensemble de ces résultats indique qu'une exposition au LPS, même périphérique, induit une neuroinflammation et entraine des conséquences cognitives. De façon intéressante, chez l'humain, la consommation d'alcool est associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dont IL-1β et TNF-α dans le sérum (McClain and Cohen 1989; McClain et al. 1999) et de plus, une corrélation positive entre les niveaux d'expression de TLR4 et l'âge de 1ère consommation d'alcool a été mise en évidence dans des cerveaux analysés en *post-mortem* (Vetreno et al. 2013).

Finalement, dans la mesure où le déclenchement d'une neuroinflammation entraine des perturbations de la mémoire hippocampo-dépendante et sachant que la consommation d'alcool est associée à une modulation des médiateurs de l'inflammation, nous avons émis

l'hypothèse que les perturbations mnésiques induites par deux épisodes de *binge drinking* à l'adolescence pouvaient engager des mécanismes neuroinflammatoires. Nous allons maintenant présenter ce que l'on sait des processus neuroinflammatoires lors d'expositions à l'éthanol.

3- Neuroinflammation et éthanol

a) Ethanol et neuroinflammation chez l'Homme

La communauté scientifique s'est intéressée au niveau de cytokines circulant dans le sérum de patients alcoolodépendants, rapportant une augmentation de IL-6 et de TNF-α (González-Quintela et al. 2000; Heberlein et al. 2014). Bien que limitées en nombre, quelques études chez l'Homme apportent les preuves d'une inflammation du SNC chez les sujets alcoolodépendants. En effet, l'analyse *post-mortem* révèle une augmentation des niveaux d'expression d'IL-1R1, de TLR7 et de HMGB1 - l'agoniste endogène de TLR4 – et du marqueur d'activation microgliale CD11b dans l'hippocampe de patients alcoolodépendants (McClintick et al. 2013; Coleman et al. 2017) ainsi qu'une augmentation de CCL2, une cytokine qui entraine la migration et l'activation de la microglie (McManus et al. 2000), dans plusieurs régions cérébrales, dont l'hippocampe (He and Crews 2008). D'ailleurs, toujours en analysant des cerveaux *post-mortem*, l'existence d'une corrélation positive entre l'expression de TLR4 et l'âge de début de consommation d'alcool a été mise en évidence (Vetreno et al. 2013). Finalement, les marqueurs cytologiques tels que Iba-1, qui révèle les microglies activées, et GFAP, un marqueur astrocytaire, sont augmentés dans le cortex préfrontal dorsolatéral des patients alcoolodépendants *post-mortem* (Rubio-Araiz et al. 2017). Ces résultats sont toutefois en désaccord avec d'autres qui ne montraient pas de différence d'activation des astrocytes dans le cortex préfrontal dorsolatéral de patients alcoolodépendants analysés en *post-mortem* (Miguel-Hidalgo et al. 2002). Toutefois, il est important de noter que ces deux études comprennent un faible nombre de sujets (17 alcoolodépendants et 9

alcoolodépendants) et dans les travaux de Rubio-Araiz et collaborateurs, l'âge moyen des sujets est supérieur à ceux de Miguel-Hidalgo et collaborateurs (51,6 vs 44,2 ans), alors que l'âge de début de la consommation d'alcool est plus précoce (17,9 vs 20,24 ans). De plus, on ne dispose pas des informations relatives aux quantités d'alcool consommées.

Outre les mesures réalisées *post-mortem*, l'analyse du liquide cérébrospinal de patients alcoolodépendants jusqu'à 4 semaines de sevrage indique que le niveau de CCL2 est augmenté de façon significative à 4 et 25 jours de sevrage, que TNF-α reste inchangé à 4 jours mais est diminué à 25 jours d'abstinence alors qu'aucune différence n'est observée pour l'IL-1β (Umhau et al. 2014). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique, malgré quelques discordances, la présence d'acteurs moléculaires majeurs de la neuroinflammation chez les sujets présentant un TUA. En revanche, on ne dispose que de peu d'informations sur les marqueurs de l'immunité au niveau cérébral dans le contexte d'une ingestion aiguë d'alcool. Gonzalez-Quintela et collaborateurs ont cependant montré que l'ingestion aiguë d'alcool (60g en 1h) chez des hommes volontaires sains entre 30 et 37 ans augmentait la cytokine pro-inflammatoire IL-8 dans le sérum après 36h, alors que le niveau d'IL-6 restait inchangé. Malheureusement, l'analyse n'a pas été réalisée à d'autres temps (Gonzalez-Quintela et al. 2000). Par ailleurs, chez des adolescents et jeunes adultes admis aux urgences en état d'ivresse (éthanolémie 2,2–2,5 g/L) une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires dans le sérum tels que l'IL-1β, IL-6, CCL2 et TLR4 est rapportée, un effet qui est plus marqué chez la femme (Pascual et al. 2017).

Ces résultats suggèrent ainsi l'induction d'une réponse inflammatoire, au moins périphérique, dans un contexte d'alcoolisation chronique mais également à la suite d'un seul épisode d'intoxication éthylique chez l'humain.

b) Neuroinflammation, alcool et modèles cellulaires

La communauté scientifique a également eu recours aux modèles cellulaires pour étudier les effets de l'éthanol sur les cellules du SNC. Vallès et collaborateurs (2004) sont

parmi les premiers à avoir montré un effet de l'éthanol sur les processus neuroinflammatoires dans des astrocytes en culture. Un traitement chronique à l'éthanol (75mM pendant 7 jours) augmente les niveaux de iNOS, COX-2, IL-1β et de NF-κB (Vallés et al. 2004). D'ailleurs, traiter les astrocytes à l'éthanol (50mM) pendant 30 minutes suffit à augmenter les niveaux d'expression protéiques de iNOS et de COX-2, et de façon intéressante, cet effet est prévenu lorsque le récepteur TLR4 est neutralisé avant l'exposition à l'éthanol (Blanco et al. 2005). Ces résultats montrent un effet de l'éthanol, que ce soit en situation d'exposition aiguë ou chronique, sur les mécanismes d'inflammation astrocytaire. Cependant, les travaux de Bell-Temin et collaborateurs, en 2013, montrent que traiter des cellules microgliales à l'éthanol (5, 25 ou 100mM) pendant 12h ne modifie pas les niveaux d'ARNm de TNF-α et IL-6 dans le milieu (Bell-Temin et al. 2013). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Boyadjieva et Sarkar qui rapportent une augmentation des niveaux protéiques de TNF-α, IL-1β et IL-6 dans le milieu de culture de cellules microgliales traitées pendant 24h à l'éthanol (50 ou 100mM) (Boyadjieva and Sarkar 2010). Ainsi, il semblerait que les cellules microgliales soient moins sensibles aux effets de l'éthanol que les astrocytes, puisqu'elles nécessitent une exposition plus longue à l'éthanol pour induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Finalement, en ce qui concerne l'effet de l'éthanol sur l'ensemble astrocytes/microglie/neurone, Zou et Crews ont utilisé un modèle de tranches hippocampe-cortex entorhinal en culture et montrent que NF-κB est augmenté lorsque les tranches sont traitées pendant 24h avec de l'éthanol à 25- 150mM (Zou and Crews 2006). Plus récemment, sur le même modèle, cette équipe a montré une augmentation de la phosphorylation de NF-κB, de TNF-α et d'IL-1β après 48h de traitement à l'éthanol (100mM). De façon intéressante, cette équipe rapporte également une augmentation de TLR7 et HMGB1. D'ailleurs, la présence d'un petit ARN interférent (*Small interfering RNA*, siRNA) dirigé contre TLR7 réduit l'augmentation du niveau d'ARNm de TNF-α induite par l'exposition à l'éthanol (Coleman et al. 2017).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montrent que l'alcool entraine une activation des acteurs de l'immunité dans l'ensemble des cellules du SNC en culture.

c) Implication de la neuroinflammation chez le rongeur exposé à l'éthanol

La majeure partie des travaux de recherche visant à déterminer la mise en place d'une neuroinflammation induite par l'alcool a toutefois été réalisée à l'aide de modèles animaux. La présence d'une neuroinflammation a été étudiée à la fois dans des modèles d'alcoolisation chronique ou aiguë (synthétisé Table 10). En effet, le niveau de protéine CCL2 est augmenté dans le cortex du rat suite à une consommation d'éthanol 20% dans l'eau de boisson durant 12 mois, associé à une activation microgliale. A l'issue de ce paradigme d'alcoolisation, les animaux présentent une perturbation de la mémoire spatiale dans un test de labyrinthe à 8 bras (Ehrlich et al. 2012). Une activation microgliale a également été rapportée dans toutes les régions de l'hippocampe suite à une exposition de 6 mois à l'éthanol 20% dans l'eau de boisson, sans modification des niveaux de cytokines (Cruz et al. 2017). Ces résultats pourraient suggérer que l'exposition de 6 mois à l'éthanol n'est pas suffisante pour que la microglie achève sa transformation phénotypique et sécrète des médiateurs inflammatoires mais toutefois, le niveau de TNF-α est augmenté dans l'hippocampe suite à une exposition à l'éthanol 20% débutant à P21 et durant seulement 6 semaines (Baradaran et al. 2021). De plus, dans le cortex cérébral de souris, la consommation d'éthanol 10% dans l'eau de boisson pendant 5 mois entraine une augmentation de NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 et du marqueur neuronal de mort cellulaire caspase-3 ainsi qu'une activation microgliale et astrocytaire et des perturbations mnésiques dans le test de reconnaissance de nouvel objet. De façon intéressante, les souris qui présentent une délétion génique de TLR4 ne présentent pas ces effets (Alfonso-Loeches et al. 2010; Pascual et al. 2011). Ainsi, ces résultats indiquent que d'une part, l'alcoolisation chronique déclenche une neuroinflammation initiée par le récepteur TLR4, et que d'autre part, cette activation de TLR4 est responsable d'une mort neuronale. Cette augmentation de la mort neuronale dans le cortex a été également identifiée par Qin et Crews en 2012, bien que la période d'alcoolisation soit plus courte : en effet, les souris adultes reçoivent 5g/kg d'éthanol par voie intra gastrique (i.g.), une fois par jour pendant 10 jours. L'augmentation de la mort neuronale est également présente dans le GD, tout comme une augmentation de NF-κB, des ROS et de l'enzyme qui les produit, la NADPH oxidase, ainsi qu'une activation microgliale et astrocytaire (Qin and Crews 2012a). Par ailleurs,

les souris présentent une augmentation des niveaux de TLR3 et HMGB1 dans le cortex ainsi qu'une augmentation périphérique et cérébrale de TNF-α, IL-6 et CCL2, 27h après la dernière administration d'éthanol. Dans ce cadre, la minocycline (50mg/kg, i.p.) administrée 30 minutes avant chaque alcoolisation, prévient l'activation microgliale induite par l'éthanol (Qin and Crews 2012b).

D'autres équipes ont tenté de mimer le comportement de *binge drinking* en instaurant des périodes d'abstinence dans leurs protocoles expérimentaux. Devant la diversité des protocoles utilisés, un schéma a été réalisé (Figure 15). Ward et collaborateurs ont modélisé le *binge drinking* par l'administration i.g. d'éthanol (2g/kg ou 3g/kg) 3 fois par jour, à 6h d'intervalle, 2 jours consécutifs, suivi de 5 jours d'abstinence. Ce profil a été répété sur une durée totale de 3 semaines pour un nombre total de 24 expositions à l'éthanol. Les auteurs montrent que chaque dose d'éthanol entraine une activation microgliale dans le gyrus denté, bien que l'activation soit plus conséquente pour la dose la plus faible d'éthanol (2g/kg). Toutefois, le nombre d'animaux par groupe est très faible (n = 4). De plus, l'analyse du niveau extracellulaire de glutamate *in vivo* dans l'hippocampe ventral par microdialyse montre une élévation du glutamate pour chaque dose d'éthanol (Ward et al. 2009). Ce résultat suggère que l'effet toxique du *binge drinking* passe par l'augmentation du niveau de glutamate extracellulaire, qui conduit à une phagocytose, avec une activation microgliale contribuant à la neuroinflammation. De façon similaire, Zhao et collaborateurs en 2013 ont soumis des rats adultes à une administration i.g. d'éthanol de 5g/kg, suivi d'administrations d'éthanol 3g/kg toutes les 8h pendant 4 jours consécutifs suivi de 3 jours de sevrage, ce motif étant répété 4 fois. Ils montrent une perturbation de la mémoire spatiale et de reconnaissance aux jours 4 et 7 après la fin du paradigme d'exposition. Aussi, ils mettent en évidence une augmentation de la mort neuronale dans toutes les régions de l'hippocampe à 1h, 4 jours et 7 jours, puis un retour au niveau contrôle à 14 jours. De plus, à 1h, la densité des épines dendritiques est diminuée mais elle est également revenue à la normale après 14 jours. Une activation microgliale est présente dans l'hippocampe dès 1h mais cet effet ne persiste pas au-delà (Zhao et al. 2013). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activation microgliale mesurée 1h après la dernière exposition à l'éthanol entraîne la mort neuronale et affecte la densité des épines dendritiques, conduisant à des perturbations mnésiques. La récupération des capacités cognitives au fil de la période d'abstinence semble alors reposer sur l'aspect transitoire de

l'activation microgliale. Les effets d'une seule séquence d'alcoolisation chronique du modèle décrit ci-dessus avaient d'ailleurs été préalablement étudiés. Chez des rats adultes exposés à des épisodes d'intoxication éthylique (EtOH 5g/kg) par voie i.g. toutes les 8h pendant 4 jours, les auteurs rapportent dans le GD une activation microgliale et une augmentation du nombre de cellules en dégénérescence immédiatement à l'issue du paradigme d'alcoolisation, une augmentation de la prolifération cellulaire 2 et 7 jours après la dernière exposition alors qu'elle est à un niveau contrôle à d'autres points temporels (24h, 3 et 4 jours, 2 et 4 semaines) et une augmentation de la neurogénèse à 14 et 35 jours d'abstinence (Obernier et al. 2002; Nixon and Crews 2004; Nixon et al. 2008; Marshall et al. 2013). Ce même paradigme a été testé chez des rats adolescents. Les auteurs montrent une diminution de la neurogénèse dans le GD, jusqu'à 2 jours après la dernière exposition à l'éthanol. De plus, la mort cellulaire est augmentée immédiatement après la dernière intoxication éthylique et le nombre de cellules en prolifération dans l'hippocampe est diminué 3h après la dernière exposition à l'éthanol puis augmenté après 2 jours d'abstinence et ces cellules sont identifiées comme étant des cellules microgliales. De façon intéressante, ces nouvelles microglies sont toujours présentes après 30 jours mais ne présentent pas de profil morphologique activé (Morris et al. 2010; McClain et al. 2011). Cette dernière observation est cohérente avec les travaux de Zahr et collaborateurs en 2010 qui montrent, dans ce même modèle d'exposition à l'éthanol, une absence de modification des niveaux des cytokines pro-inflammatoires (Zahr et al. 2010). L'ensemble de ces travaux montrent un effet à long terme d'une séquence de 12 expositions à l'éthanol à la fois chez l'adulte et chez l'adolescent, et l'absence d'activation microgliale suggère que ces premiers *binges* constituent un processus d'amorçage au cours duquel les microglies sont sensibilisées et susceptibles d'adopter un phénotype pro-inflammatoire en réponse aux épisodes suivants d'intoxications éthyliques. Toutefois, on regrette la présence de divergences dans les études citées ci-dessus, avec des points temporels et des marqueurs (notamment microgliaux) qui diffèrent d'une étude à l'autre. Ce manque d'homogénéité représente un obstacle dans l'interprétation de ces travaux et il est difficile de conclure de façon concise. Une activation microgliale persistante sans modification du niveau de cytokines pro-inflammatoires a toutefois été également rapportée dans un modèle d'exposition à des vapeurs d'éthanol (10h par jour pendant 35 jours), où les rats atteignent des éthanolémies de 1,5 à 2g/L (Sanchez-Alavez et al. 2019).

Les modèles d'expositions intermittentes à l'éthanol présentés ci-dessus sont constitués de périodes d'alcoolisation relativement longues. Ainsi, Broadwater et collaborateurs, en 2014, ont travaillé sur un modèle d'exposition intermittente à l'éthanol avec des périodes d'alcoolisation plus ponctuelles en soumettant des rats à des administrations d'éthanol 4g/kg i.g. toutes les 48h pendant l'adolescence (P28 à P48) ou à l'âge adulte (P70-P90) pour un total de 11 expositions à l'éthanol. Trois semaines après l'exposition, la neurogénèse est diminuée et la mort cellulaire augmentée dans le GD uniquement chez les rats soumis aux alcoolisations à l'adolescence, suggérant une différence de vulnérabilité à l'éthanol entre adolescents et adultes (Broadwater et al. 2014). Finalement, Pascual et collaborateurs ont étudié l'implication de la neuroinflammation dans un modèle différent d'exposition intermittente à l'éthanol durant l'adolescence. Dans ces travaux, les rats adolescents ont reçu une intoxication éthylique (3g/kg, i.p.) deux jours de suite, suivi de deux jours d'abstinence, et ce profil a été répété 4 fois, pour un total de 8 intoxications éthyliques. 24h après la dernière intoxication éthylique, les niveaux protéiques de COX-2 et de iNOS sont augmentés dans plusieurs structures cérébrales dont l'hippocampe. De plus, le marqueur de mort cellulaire caspase-3 est augmenté dans ces régions, et ceci est associé à une augmentation de l'apoptose. Au niveau comportemental, les animaux présentent des perturbations mnésiques dans un test de reconnaissance de nouvel objet, lorsque le test est réalisé 24h après la fin du paradigme d'exposition à l'éthanol, un effet qui perdure jusqu'à l'âge adulte. De façon intéressante, l'administration d'indométhacine, un inhibiteur non séléctif des COX, 30 minutes avant chaque intoxication éthylique, prévient l'ensemble des effets de l'éthanol sur les marqueurs de l'inflammation et de mort cellulaire dans l'hippocampe, mais également les perturbations mnésiques, à la fois à l'adolescence et à l'âge adulte (Pascual et al. 2007). De façon cohérente, la même équipe a rapporté, chez des souris adolescentes ayant subi le même paradigme d'exposition de type *binge drinking*, une augmentation des niveaux de iNOS, COX-2, IL-1β, TNF-α et HMGB1 dans le cortex préfrontal des souris 24h après le dernier épisode d'intoxication éthylique. D'ailleurs, la mémoire de reconnaissance est également perturbée et tous ces effets ne sont pas retrouvés chez des souris dont le gène codant pour le récepteur TLR4 a été délété (Montesinos et al. 2015). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique un rôle clé du récepteur TLR4 dans les effets d'une exposition de type *binge drinking* à l'adolescence. D'ailleurs, cette proposition est en accord avec les travaux précédents de Fernandez-Lizarbe et collaborateurs (2009) qui ont montré une

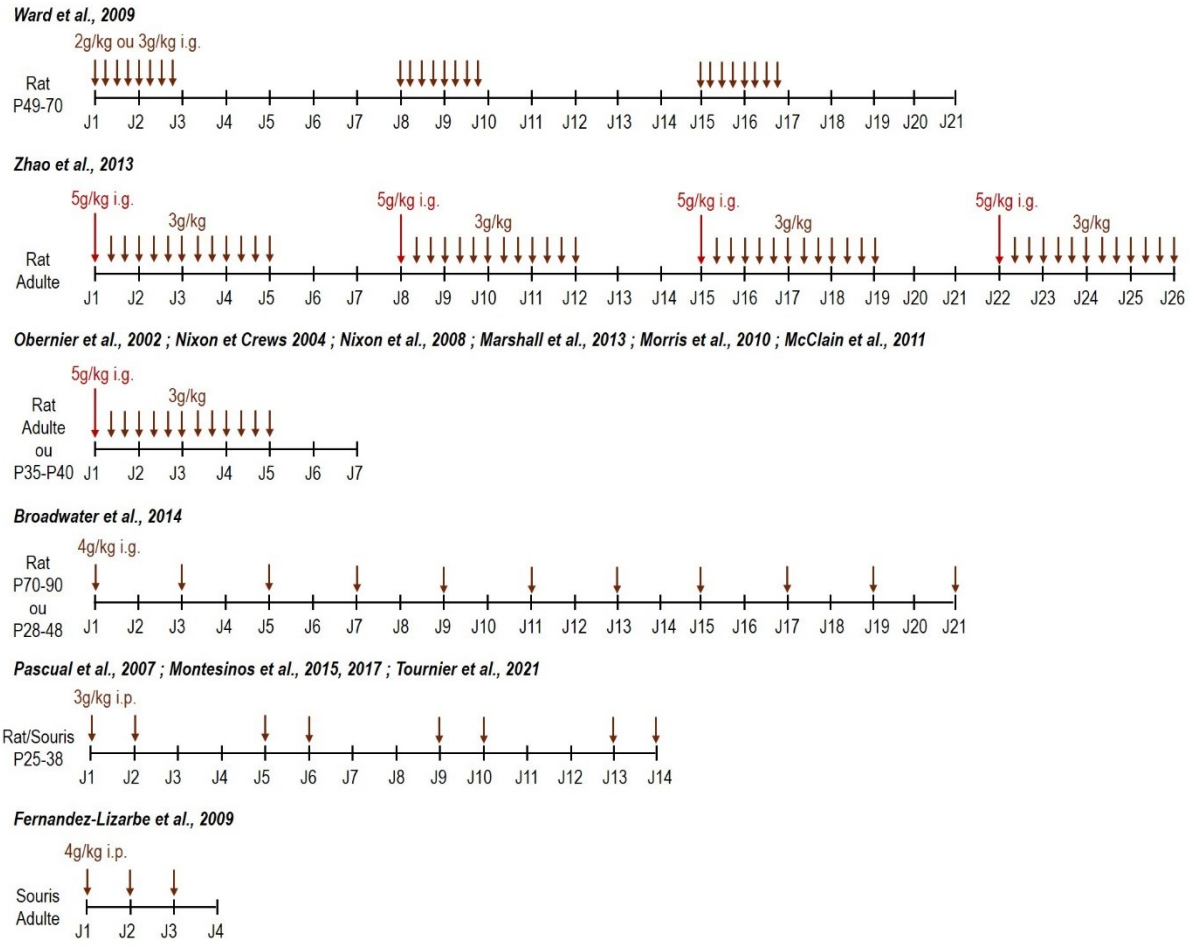
activation microgliale après 24h dans le cortex de souris adultes ayant reçu une intoxication éthylique (4g/kg, i.p.) pendant 3 jours consécutifs qui n'est pas retrouvé chez des souris ayant subi une délétion du gène codant pour le récepteur TLR4, suggèrant que l'activation microgliale induite par l'éthanol requiert bien le récepteur TLR4 (Fernandez-Lizarbe et al. 2009). De plus, le nalméfène, un antagoniste des récepteurs aux opioïdes mais également du récepteur TLR4, prévient les effets de l'éthanol sur les marqueurs neuroinflammatoires dans le modèle d'alcoolisation intermittente de type *binge drinking* développé par Pascual et coll. (2007) (Montesinos et al. 2017). Finalement et très récemment, toujours dans ce modèle d'exposition intermittente à l'éthanol, une réponse neuroimmune dans l'hippocampe, le striatum et le cervelet a été mise en évidence chez le rat par la technique de tomographie par émission de positron (TEP), un effet prévenu par le nalméfène (Tournier et al. 2021). Ainsi, l'ensemble de ces études apportent des preuves expérimentales concernant l'implication du récepteur TLR4 dans les effets d'expositions répétées à l'éthanol.

Toutefois, si la répétition d'intoxications éthyliques induit une neuroinflammation à la fois à l'adolescence et à l'âge adulte, on peut se poser la question de savoir à partir de combien d'épisodes de *binge drinking* les perturbations mnésiques apparaissent et si cela implique le récepteur TLR4. Dans ce contexte, un seul épisode d'alcoolisation (1; 2,5 ou 5g/kg, i.g. conduisant à des éthanolémies respectives de 0,33; 0,72 et 1,31g/L) à l'adolescence diminue de façon dose dépendante la prolifération cellulaire dans le GD des rats, 5h après l'administration. Une diminution significative de la neurogénèse dans le GD est également observée 3 jours après l'éthanol 5g/kg (Crews et al. 2006). Ces résultats suggèrent ainsi que le tout premier épisode de binge suffit à entrainer une diminution de la neurogénèse dans l'hippocampe. Walter et Crews se sont également intéressés à l'effet d'une exposition aigüe à l'éthanol (6g/kg ; i.g.) chez la souris adulte et montrent une activation de la microglie 12h après l'intoxication éthylique qui persiste à 24h. De plus, l'expression génique de TNF-α et CCL2 est augmentée dans le cerveau 18h après l'intoxication éthylique, au moment où l'éthanolémie revient à zéro. Cette augmentation est d'ailleurs transitoire puisque les niveaux de TNF-α et CCL2 sont inchangés à 12h et 24h, par rapport aux contrôles. Ainsi, l'augmentation de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires apparait bien après l'activation microgliale, suggérant que la réponse inflammatoire induite par l'intoxication éthylique dépend de la microglie (Walter and Crews 2017). Cependant, ces résultats sont en désaccord

avec ceux de Qin et collaborateurs, en 2008, qui ont montré que les niveaux de TNF-α et CCL2 étaient toujours augmentés dans le cerveau 25h après une seule intoxication éthylique à 5g/kg, i.g. (Qin et al. 2008). Cette divergence pourrait s'expliquer par l'âge des animaux, qui sont à la sortie de l'adolescence dans les travaux de Qin et coll. (8 semaines), par rapport aux travaux de Walter et Crews où les souris sont adultes (12 semaines). Si l'âge doit être pris en compte dans les résultats précédents, cela indiquerait que l'effet transitoire d'une seule intoxication éthylique sur les processus neuroinflammatoires serait variable en fonction de l'âge, ou que la réponse serait plus rapide chez l'adulte que chez l'adolescent. Dans ce cadre, les travaux de Doremus-Fitzwater chez le rat adulte (EtOH 4g/kg, i.p.) montrent que l'expression génique de l'IL-1β est augmentée dans l'hippocampe 15h post-injection, un effet très transitoire puisque le niveau est revenu à la normale 3h plus tard. De plus, l'effet de l'éthanol sur l'IL-6 semble plus précoce puisqu'il est augmenté dès 3h et jusqu'à 18h post-injection. Finalement et à l'inverse des études précédentes, le TNF-α est diminué dès 3h et à 18h post-injection (Doremus-Fitzwater et al. 2014). La même équipe s'est également intéressée aux effets de la même exposition à l'éthanol chez le rat adolescent. Ils retrouvent le même effet sur le TNF-α à 3h chez l'adolescent et chez l'adulte (Doremus-Fitzwater et al. 2015).

Ainsi, dans l'ensemble, ces études confirment que l'éthanol est un activateur potentiel des processus neuroinflammatoires au niveau cérébral, que ce soit à l'âge adulte ou à l'adolescence, et ceci dès la première intoxication éthylique à 4g/kg. De plus, la neuroinflammation induite à l'adolescence semble responsable de perturbations cognitives qui persistent à l'âge adulte. Certains travaux montrent que le récepteur TLR4 est particulièrement impliqué dans les effets de l'éthanol, et que la microglie a un rôle prépondérant. Toutefois, seul un petit nombre d'équipes de recherche ont collecté ces données, ce qui limite un peu la reproductibilité des résultats. Effectivement, la divergence dans les résultats obtenus suite aux épisodes d'intoxication éthylique met en lumière la complexité des processus inflammatoires engagés, d'autant plus que cela semble dépendre de l'âge, du nombre d'expositions à l'éthanol, de la dose d'éthanol administrée et donc de l'éthanolémie atteinte, des périodes d'alcoolisation et/ou d'abstinence, ainsi que de la structure cérébrale étudiée. D'ailleurs, les études qui s'intéressent aux expositions aigües à l'éthanol rapportent une implication de la neuroinflammation relativement transitoire, et il

semblerait que ce soit la répétition de ces épisodes d'intoxications éthyliques qui rendent cette neuroinflammation persistante. Si les processus neuroinflammatoires semblent mis en jeu dès le premier épisode de type *binge drinking* où l'éthanolémie est importante (>3g/L), aucune étude ne s'est toutefois intéressée aux effets de cette neuroinflammation transitoire sur les processus mnésiques et encore moins sur leurs mécanismes cellulaires dans l'hippocampe dans le contexte d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol de type *binge drinking*. En s'appuyant sur cette littérature, nous avons cherché à savoir si les perturbations cognitives et de plasticité synaptique que nous avons précédemment rapportées suite à deux épisodes d'intoxication éthylique à l'adolescence reposaient sur le déclenchement de processus neuroinflammatoires.



<u>Figure 15 :</u> Les différents protocoles d'exposition intermittente de type *binge drinking* utilisés dans les travaux portant sur la neuroinflammation.

Source : Deschamps C.

	Protocole	Age	Structure cérébrale	Effet moléculaire	Effet comportemental	Référence
CHRONIQUE	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 12 mois	Adulte	Cortex	Activation microgliale ↗ CCL2	Déficits cognitifs	*Ehrlich et al., 2012*
	EtOH 20% dans l'eau de boisson, 6 mois	Adulte	Hippocampe (gyrus denté, CA1/2/3)	Activation microgliale		*Cruz et al., 2017*
	EtOH 10% dans l'eau de boisson, 5 mois	Adulte	Cortex	↗ NF-κB, TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2, Caspase-3		*Alfonso-Loeches et al., 2010*
				Activation microgliale et astrocytaire	Déficits cognitifs	*Pascual et al., 2011*
	EtOH inhalation 10h/jour pendant 35 jours	Adulte	Cortex frontal, amygdale, hippocampe, cervelet	Activation microgliale		*Sanchez-Alavez et al., 2019*
	EtOH 5g/kg i.g. 1x/jour pendant 10 jours	Adulte	Cortex	↗ mort neuronale Activation microgliale et astrocytaire ↗ TLR3, HMGB1, ROS, NADPH oxidase		*Qin et Crews, 2012a,b*
			Gyrus denté	↗ mort neuronale Activation microgliale et astrocytaire ↗ NF-κB, ROS, NADPH oxidase		
			Cerveau entier	↗ TNF-α, IL-6, CCL2		
	EtOH 2g/kg ou 3g/kg i.g. toutes les 6h pendant 2 jours puis 5 jours d'abstinence **Répété pendant 3 semaines**	7 à 10 semaines	Hippocampe ventral	Activation microgliale ↗ Glutamate extracellulaire		*Ward et al., 2009*
	EtOH 5g/kg puis 3g/kg i.g. toutes les 8h pendant 4 jours puis 3 jours d'abstinence **Répété 4 fois**	Adulte	Hippocampe (gyrus denté, CA1/2/3)	↗ mort neuronale ↘ densité épines dendritiques	Déficits cognitifs	*Zhao et al., 2013*
	EtOH 5g/kg puis 3g/kg i.g. toutes les 8h pendant 4 jours	Adulte	Gyrus denté	Activation microgliale ↗ dégénérescence et prolifération cellulaire ↗ neurogénèse après 14 jours d'abstinence		*Obernier et al., 2002 ; Nixon et al., 2004, 2008 ; Marshall et al.,2013*
	EtOH 5g/kg puis 3g/kg i.g. toutes les 8h pendant 4 jours	Adolescent	Gyrus denté	↘ neurogénèse ↗ mort cellulaire ↘ puis ↗ prolifération microgliale		*Morris et al., 2010 ; McClain et al., 2011*
	EtOH 4g/kg i.g. 1x toutes les 48h pour un total de **11 administrations**	Adolescent	Gyrus denté	↘ neurogénèse ↗ mort cellulaire		*Broadwater et al., 2014*
		Adulte		Ø effet		
	EtOH 3g/kg i.p. 1x/jour pendant 2 jours suivi de 2 jours d'abstinence **Répété 4 fois**	Adolescent	Hippocampe	↗ COX-2, iNOS, caspase-3 ↗ Apoptose	Déficits cognitifs qui persistent à l'âge adulte	*Pascual et al., 2007*
			Cortex préfrontal	↗ iNOS, TNF-α, IL-1β, HMGB1, COX-2	Déficits cognitifs à l'âge adulte	*Montesinos et al., 2015*
					↗ Consommation volontaire d'éthanol	*Montesinos et al., 2017*

	EtOH 4g/kg i.p. 1x/jour pendant 3 jours	Adulte	Cortex	Activation microgliale	*Fernandez-Lizarbe et al., 2009*
AIGU	EtOH 1g/kg i.g.	Adolescent	Gyrus denté	Ø effet	*Crews et al., 2006*
	EtOH 2,5g/kg i.g.			↘ prolifération cellulaire	
	EtOH 5g/kg i.g.			↘ prolifération cellulaire ↘ neurogénèse	
	EtOH 5g/kg i.g.	Fin adolescence	Cerveau entier	↗ TNF-α, CCL2	*Qin et al., 2008*
	EtOH 6g/kg i.g.	Adulte	Cerveau entier	Activation microgliale ↗ TNF-α, CCL2	*Walter et Crews 2017*
	EtOH 4g/kg i.p.	Adulte	Hippocampe	↗ IL-1β, IL-6 ↘ TNF-α	*Doremus-Fitwater et al., 2014, 2015*
		Adolescent		↘ TNF-α	

Table 10 : Les effets d'une exposition à l'éthanol sur les processus neuroinflammatoires.

QUESTIONS SCIENTIFIQUES

La revue de la littérature indique que la consommation d'éthanol, même lorsqu'elle ne s'inscrit pas dans une modalité de consommation chronique, peut altérer les processus mnésiques. De plus, quelques études mettent en avant une plus grande vulnérabilité du cerveau à l'adolescence, lorsque celui-ci n'a pas encore achevé sa maturation. Ce travail de thèse vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires par lesquels l'éthanol entraine des pertes de mémoire après un nombre restreint d'épisodes de type *binge drinking* à l'adolescence. En effet, le laboratoire a précédemment montré chez le rat adolescent (45-55 jours) que des déficits mnésiques survenaient 48h après seulement deux épisodes de *binge drinking* (EtOH 3g/kg ; i.p.; 9h d'intervalle), en même temps qu'une abolition de la DLT ainsi qu'une augmentation de la PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Ces altérations comportementales et électrophysiologiques étaient accompagnées d'une augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE lié aux récepteurs NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B, suggérant une modification du rôle de cette sous-unité (Silvestre de Ferron et al., 2015). Parmi les mécanismes cellulaires pressentis qui pourraient être responsables des effets observés à distance des alcoolisations, les mécanismes épigénétiques et neuroinflammatoires semblent être de bons candidats. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été de déterminer, chez le rat adolescent/jeune adulte, si les mécanismes épigénétiques étaient impliqués dans les effets de seulement deux épisodes de type *binge drinking* sur les processus mnésiques hippocampo-dépendants et leurs corrélats cellulaires. Pour tester cette hypothèse et en se basant sur la littérature qui indique un rôle prépondérant de HDAC2 dans la mémoire, nous avons mesuré le taux d'expression de HDAC2 48h après les deux épisodes de type *binge drinking*, au moment où l'apprentissage et la plasticité synaptique sont perturbés. De plus, dans ce contexte, nous avons tenté de prévenir les effets de l'éthanol par l'administration de butyrate de sodium (NaB), un inhibiteur des HDAC. Le second objectif de cette thèse était d'investiguer l'implication de mécanismes neuroinflammatoires dans les effets des deux épisodes d'intoxication éthylique en mesurant le niveau d'expression des médiateurs de l'inflammation et par l'administration de substances anti-inflammatoires.

MATERIELS ET METHODES

Toutes les expériences ont été effectuées en accord avec les instructions pour le bien-être et l'utilisation des animaux de la Communauté Européenne (2010/63/UE, CE Off. J. 20 octobre 2010), le décret n° 2013-118 (J.O. République française, 2013) et les règles du comité d'éthique de l'UPJV (CREMEAP ; projets autorisés N° 3829 et 20838).

I- Animaux

Les animaux utilisés dans l'ensemble des expériences sont des rats mâles de la souche Sprague-Dawley, issus de l'élevage Charles River et en provenance d'Italie. Ils sont utilisés entre 45 et 55 jours postnatal, une période définie par Schneider en 2013 comme la fin de l'adolescence, le début de l'âge adulte chez l'homme (Schneider, 2013). Les animaux sont hébergés dans une animalerie climatisée qui dispose de portoirs ventilés où la température de l'air est contrôlée (21 ± 1°C), l'humidité maintenue entre 45 et 65% et l'éclairage suit un rythme artificiel jour/nuit de 12h. Les rats sont hébergés à plusieurs par cage, afin de diminuer le stress dü à l'isolement des individus. Les animaux disposent d'eau et de nourriture *ad libitum* (*DIETEX France Saint-Gratien*) et arrivent au minimum une semaine avant le début des expériences.

II- Protocole d'alcoolisation et traitements pharmacologiques

L'alcoolisation de type *binge drinking* a été mimée par deux administrations d'éthanol dosé à 3g/kg et injecté à 9h d'intervalle par voie intrapéritonéale (i.p.), conduisant à une éthanolémie proche de 2g/L après 30 minutes (Silvestre de Ferron et al. 2015). L'éthanol *(VWR, Strasbourg, France)* était préparé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) à une concentration finale de 20% en accord avec la table de dilution de l'éthanol de Gay-Lussac.

Afin de déterminer les mécanismes neurobiologiques d'action de l'éthanol sur l'hippocampe et la mémoire, nous avons administré, 30 minutes avant chaque injection d'éthanol, plusieurs agents pharmacologiques : le butyrate de sodium, un inhibiteur HDAC de

classe I et IIa (NaB ; 600mg/kg ; i.p.) (Simon-O'Brien et al. 2015), la Trichostatin A, un inhibiteur HDAC de classe I et II (TSA ; 2mg/kg ; i.p.) (Pandey et al. 2008), la minocycline, un antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices (MINO ; 45mg/kg ; i.p.) (Wang et al. 2015; Haber et al. 2018), l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien (INDO ; 4mg/kg ; i.p.) (Pascual et al. 2007; Vetreno et al. 2018) et le TAK-242, un antagoniste du récepteur TLR4 (TAK-242 ; 3mg/kg ; i.p.) (Hwang et al. 2017a) (Figure 16). Le NaB (Sigma Aldrich, France) et la minocycline hydrochloride (Hello Bio, Royame-Uni) ont été préparés dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%), la TSA (Hello Bio, Royame-Uni) a été préparée dans du sérum physiologique contenant 20% de dimethylsulfoxide (DMSO), l'indométhacine (Hello Bio, Royame-Uni) a été préparée dans du sérum physiologique contenant 2% de DMSO et le TAK-242 (Sigma Aldrich, France) a été préparé dans du sérum physiologique contenant 1% de DMSO. Les animaux contrôles ont reçu des injections i.p. de sérum physiologique à volume équivalent selon le même protocole et l'ensemble des expériences a été réalisé 48h après la première administration d'éthanol.

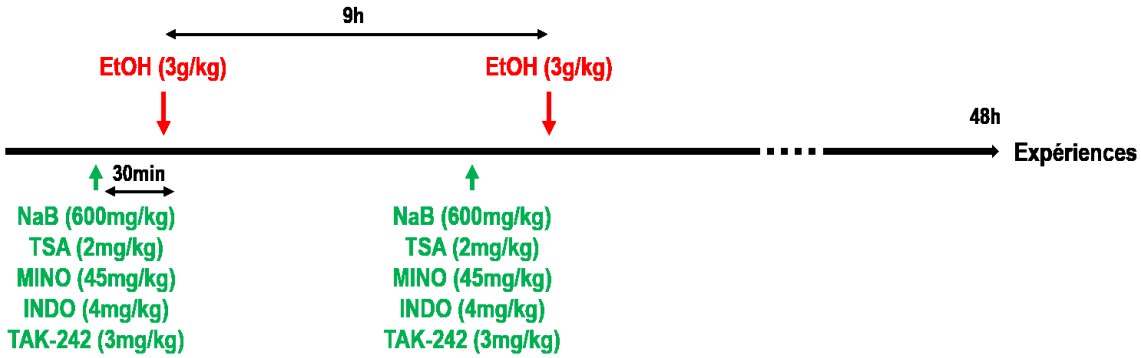


Figure 16 : Protocole d'injection utilisé.

III- Protocoles expérimentaux

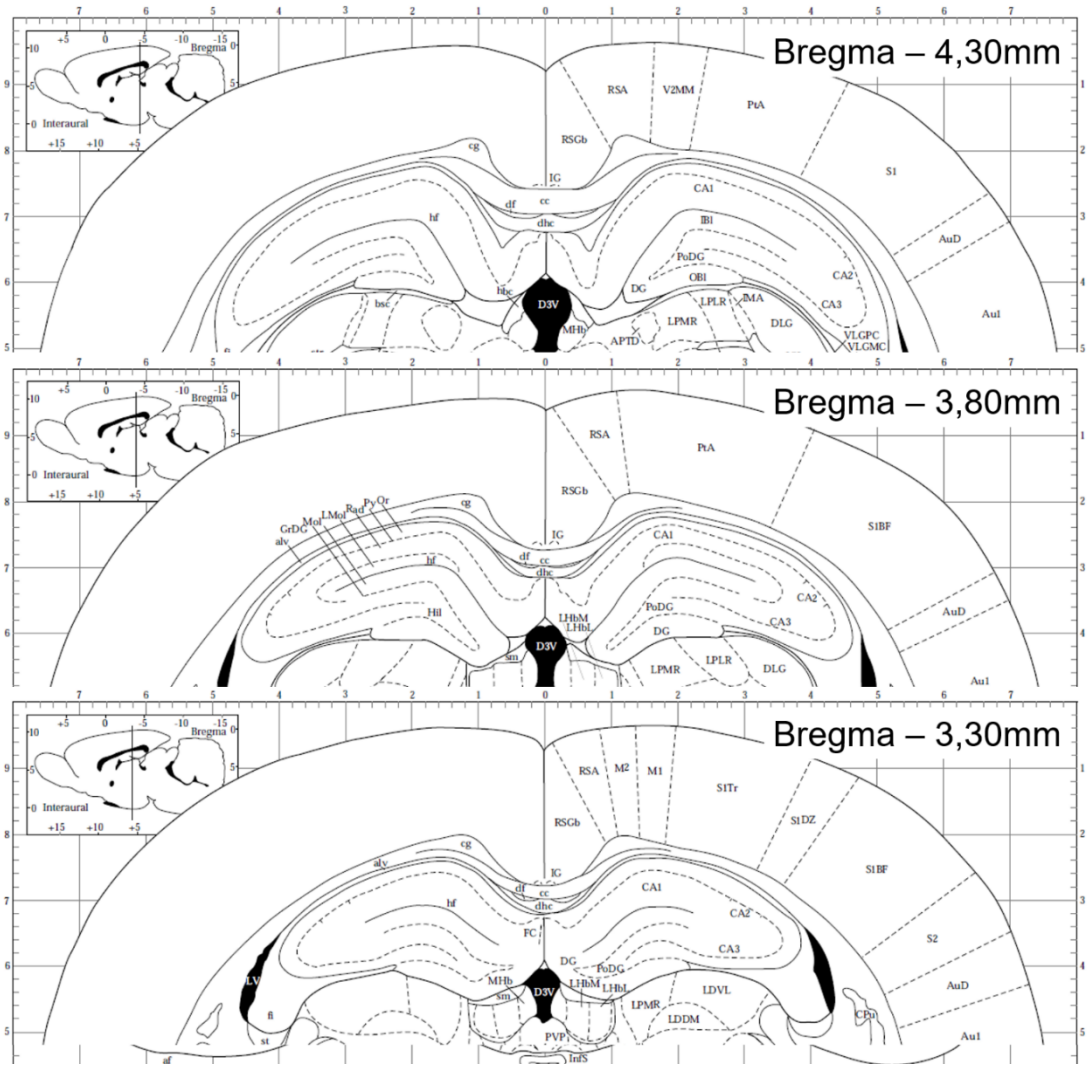
1- Electrophysiologie de champ

a) Préparation des tranches

Les animaux sont placés dans un cristallisoir et anesthésiés à l'isoflurane (IsoVet) puis décapités. Rapidement, les cerveaux sont extraits dans une solution de coupe à 4°C (Table 11) saturée en oxygène par un bullage au carbogène (95% O_2 ; 5% CO_2), enrichie en Mg^{2+} et pauvre en Ca^{2+} dans le but de diminuer l'excitabilité des neurones et ainsi promouvoir la survie neuronale. Après avoir retiré le cortex préfrontal et le cervelet, les cerveaux sont collés à la verticale puis placés dans un vibratome (Leica VT 1200S) pour générer des tranches coronales d'hippocampe de 400µm d'épaisseur. Uniquement les hippocampes dorsaux (Figure 17) sont conservés et le cortex et le thalamus sont retirés. Les hippocampes isolés sont ensuite transférés dans un bécher contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) (Table 11) oxygéné à température ambiante, où ils reposeront pendant au minimum 2h.

	Coupe (mM)	LCRa (mM)
Sucrose	220	-
NaCl	-	125
KCl	2	3
NaH_2PO_4	1,3	1,25
$NaHCO_3$	26	25
$MgCl_2$	6	1,3
$CaCl_2$	0,2	2,3
Glucose	10	10

Table 11 : Composition des solutions de coupe et de liquide céphalo-rachidien artificiel en millimolaire.

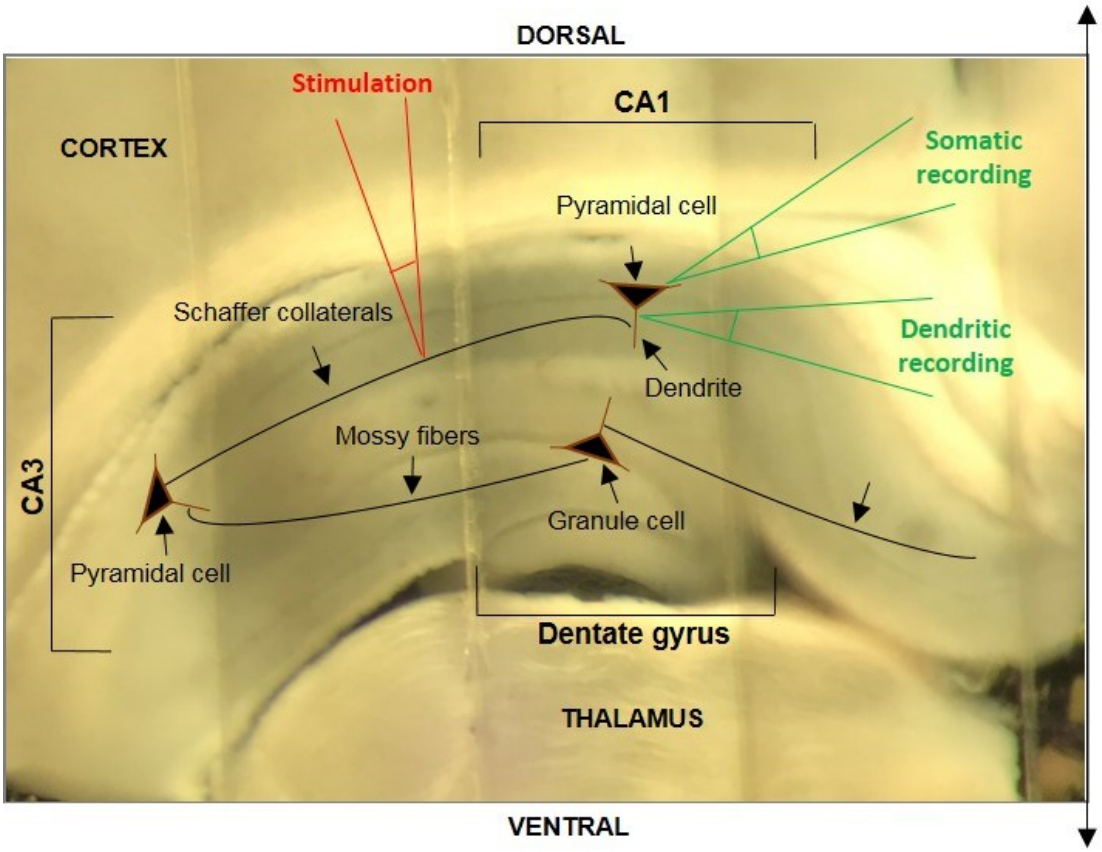


<u>Figure 17</u> : Représentation des tranches d'hippocampes dorsaux générées pour les expériences, selon l'atlas de (Paxinos and Watson 1998)

b) Enregistrements

Une fois le temps de repos terminé, une tranche est transférée dans la chambre d'enregistrement contenant du LCRa oxygéné circulant à 6mL/min. Dans la mesure où la température d'enregistrement du LCRa peut bloquer l'induction de la DLT dans l'hippocampe (Young et al. 2001), celle-ci est maintenue à 28 ± 1°C. Les signaux sont enregistrés dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Une électrode de stimulation bipolaire en tungsten (0.5MΩ, WPI,

Royaume-Uni) est placée dans *le stratum radiatum* au niveau des collatérales de Schaffer. Cette électrode est reliée à un boitier de stimulation qui délivre des créneaux de courant de 0,1ms de durée et d'intensité variable (Stimulus Isolator A365, WPI, Royaume-Uni). Le signal de réponse extracellulaire est recueilli à l'aide d'une microélectrode en verre (capillaire en verre étiré ; Harvard Apparatus 1,5mm O.D x 1,17mm I.D, Phymep, France) remplie d'une solution de NaCl 3M dans laquelle plonge un fil d'argent. L'électrode d'enregistrement est placée au niveau de l'aire CA1. Si l'on souhaite recueillir un signal au niveau somatique, nous placerons l'électrode d'enregistrement dans le *stratum pyramidale* ; il s'agira alors d'un potentiel d'action d'une population de neurones pyramidaux. En revanche, si l'on souhaite recueillir un signal au niveau synaptique, l'électrode d'enregistrement est placée dans le *stratum radiatum*, on recueille alors des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) (Figure 18). Quel que soit le signal, celui-ci est amplifié (P511 AC AMPLIFIER, GRASS), filtré (Hum Bug 50/60 Hz Noise Eliminator, WPI, Royaume-Uni) et transféré vers un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface (micro 1401, CED) afin d'être visualisé à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement de donnée Signal (CED, Cambridge, Royaume-Uni).



<u>Figure 18</u> : Photographie d'une tranche d'hippocampe dorsal sur laquelle sont schématisés le circuit trisynaptique de l'hippocampe et l'emplacement des électrodes de stimulation et d'enregistrement. Source : Deschamps C.

Une fois le signal obtenu, il convient de laisser stabiliser le signal quelques minutes. Pour chaque signal, une courbe intensité-réponse (Input/Output ; I/O) est réalisée dans le but d'évaluer l'état d'excitabilité de la tranche et de déterminer la réponse maximale de celle-ci. Selon les travaux de Staubli et Ji en 1996, l'amplitude de la DLT ainsi que sa nature (homosynaptique ou hétérosynaptique) varie en fonction du pourcentage de la réponse maximale à laquelle on se place pour déclencher la DLT (Staubli and Ji 1996). Ainsi, dans le but d'homogénéiser nos enregistrements, toutes nos expériences ont été réalisées à 50 ± 5% de la réponse maximale. Dans le cadre d'enregistrements de potentiels d'action de champ, nous mesurerons son amplitude. Pour les enregistrements de PPSE de champ, nous mesurerons la pente.

Concernant les enregistrements de plasticité synaptique, une ligne de base déterminée à 50 ± 5% de la réponse maximale et d'une durée minimale de 10 minutes est réalisée. Lors d'enregistrements de PLT, les tranches sont stimulées à une fréquence de 0,1Hz pendant la ligne de base et la PLT est induite par un protocole de stimulation à haute fréquence (SHF) qui consiste en 2 trains de stimulations à 20Hz, 3 trains de stimulations à 33Hz ou 2 trains de stimulations à 50Hz. Lors d'enregistrements de DLT, les tranches sont stimulées à une fréquence de 0.033Hz pendant la ligne de base et la DLT est induite à l'aide d'un protocole de stimulation à basse fréquence qui consiste en 900 paires de stimulations à 200ms d'intervalle et répétées à la fréquence de 1Hz (pLFS 200-900). Concernant l'étude des effets de l'IL-1β sur la DLT, l'IL-1β (Sigma-Aldrich, France) a été utilisée à une concentration de 30ng/mL et appliquée directement dans le bain d'enregistrement contenant 1µg/mL d'albumine de sérum bovin 30 minutes avant l'induction de la DLT (Nisticò et al., 2013).

Concernant les mesures de sensibilité pharmacologique des PPSE dépendants des récepteurs NMDA, ceux-ci sont d'abord isolés pharmacologiquement à l'aide d'un LCRa contenant une faible concentration de Mg^{2+}, 20µM de bicuculline (Hello Bio, UK), un antagoniste des récepteurs $GABA_A$ et 10µM de 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX ; Sigma-Aldrich, France), un antagoniste des récepteurs AMPA/Kaïnate (Silvestre de Ferron et

al. 2015). Suite à l'établissement de la ligne de base (minimum 10 minutes de stabilité et ± 5% de variation) l'implication des différentes sous-unités est estimée par application dans le bain de NVP AAM077 (Sigma-Aldrich, France) à 20nM (Neyton and Paoletti 2006) un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2A ; et de Ro25-6981 (Hello Bio, UK) à 5µM (Silvestre de Ferron et al. 2015), un antagoniste spécifique de la sous-unité GluN2B (Fischer et al. 1997). A la fin de l'enregistrement, la nature NMDA du PPSE est vérifiée par l'utilisation de 50µM de DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5 ; Hello Bio, UK), un antagoniste compétitif du récepteur NMDA (de Mendonça and Ribeiro 2000).

c) Analyse des signaux électrophysiologiques

Les signaux électrophysiologiques sont recueillis à l'aide du logiciel Signal. Concernant les enregistrements de plasticité synaptique, l'amplitude/pente des signaux est analysée à l'aide du logiciel Excel, moyennée par minute et exprimée en pourcentage de variation de l'amplitude/pente du signal par rapport à la ligne de base. La ligne de base renvoie à l'amplitude/pente du signal pendant les 10 minutes de ligne de base précédant l'induction de la PLT/DLT. Les graphes ont été réalisés à partir du logiciel GraphPad. L'analyse statistique consiste à comparer le pourcentage de variation entre les 10 dernières minutes de l'enregistrement et la ligne de base entre les groupes en appliquant une ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées et, si nécessaire, une analyse post hoc (test de Tukey) avec un seuil de significativité fixé à $P < 0,05$ à partir du logiciel SigmaPlot.

Concernant la sensibilité pharmacologique du PPSE-NDMA, la pente du PPSE est analysée à partir du logiciel Excel et l'effet des substances pharmacologiques est exprimé en pourcentage d'inhibition par rapport à la pente mesurée pendant la ligne de base. Les histogrammes sont réalisés à partir du logiciel GraphPad et les traces du PPSE sont montées à partir du logiciel InkScape. Les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel SigmaPlot à partir d'une ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées et, si nécessaire, une analyse post hoc (test de Tukey) avec un seuil de significativité fixé à $P < 0,05$.

2- Test de reconnaissance de nouvel objet

Le test de reconnaissance de nouvel objet repose sur le comportement exploratoire spontané de l'animal (Ennaceur and Delacour 1988) et permet d'évaluer la mémoire déclarative des rongeurs (Clark and Martin 2005). Ce test se déroule en trois phases : habituation, apprentissage, reconnaissance (Figure 19). L'intensité lumineuse de la pièce est fixée à 30 lux et cette valeur reste inchangée pendant toute la durée de l'expérience. Dans un premier temps, les animaux sont placés dans l'enceinte en plexiglas (45x45x45cm) vide afin de palier à une éventuelle anxiété des rats qui serait due à la méconnaissance du lieu : c'est la phase d'habituation. Une fois les rats traités selon le protocole choisi, nous passons après 48h à la seconde phase du test : l'apprentissage. Les rats sont placés dans l'enceinte et confrontés à deux objets inconnus A et B pendant 10 minutes, qu'ils explorent librement (Stefanko et al. 2009). Chacun des objets est nettoyé (EtOH 70%) entre chaque animal et les objets sont de formes bien distinctes afin d'éviter toute confusion. Les objets sont suffisamment lourds pour ne pas être déplacés par les rats, ils sont placés en diagonale à équidistance des parois de l'enceinte et replacés au même endroit après le nettoyage grâce à une marque dessinée au sol. 48 heures après la phase d'apprentissage, dernière phase du test : les rats sont à nouveau placés dans l'enceinte avec un des deux objets précédemment rencontré (A ou B) et un nouvel objet - l'objet C - pendant 5 minutes (Silvestre de Ferron et al. 2015). Nous avons choisi une durée de phase de rétention plus courte que la phase d'apprentissage car celle-ci peut diminuer l'effet de nouveauté, comme suggéré dans la littérature (Bevins and Besheer 2006). Afin de s'affranchir d'un biais lié à la préférence spontanée de l'animal pour un des deux objets, nous avons alterné l'objet familier lors de la phase de reconnaissance : la moitié de la cohorte a conservé l'objet A, et l'autre moitié a conservé l'objet B. A l'issue de ce test, si l'animal n'a pas de problème mnésique, il devrait passer plus de temps sur le nouvel objet par rapport à l'objet familier qu'il connait déjà. Au contraire, si l'animal a des problèmes mnésiques, il devrait passer autant de temps sur chacun des objets puisqu'il n'a pas mémorisé l'objet familier. Chaque phase du test est filmée à l'aide du logiciel Pinnacle Studio HD v.15 software. Nous considérons qu'il y a exploration lorsque l'animal entre en contact avec l'objet par le museau ou la gueule, et lorsqu'il y a activation des vibrisses. En revanche, si l'animal monte ou s'appuie sur l'objet sans que le museau soit dirigé vers ce dernier, ceci n'est pas

considéré comme de l'exploration. Les analyses ont été réalisées en aveugle avec deux expérimentateurs différents et les résultats ont été comparés. En cas d'écart supérieur à 5%, une 3ème analyse a été réalisée en présence des deux expérimentateurs afin de statuer. Le pourcentage d'exploration de l'objet a été calculé comme suit : temps passé sur l'objet C (%) = [objet C (s) / (objet A ou B (s) + objet C (s))] x 100. Les animaux présentant un temps total d'exploration inférieur ou égal à 10 secondes ont été exclus. Les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel SigmaPlot à partir d'une ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées et, si nécessaire, une analyse post hoc (test de Tukey) avec un seuil de significativité fixé à $P < 0,05$.

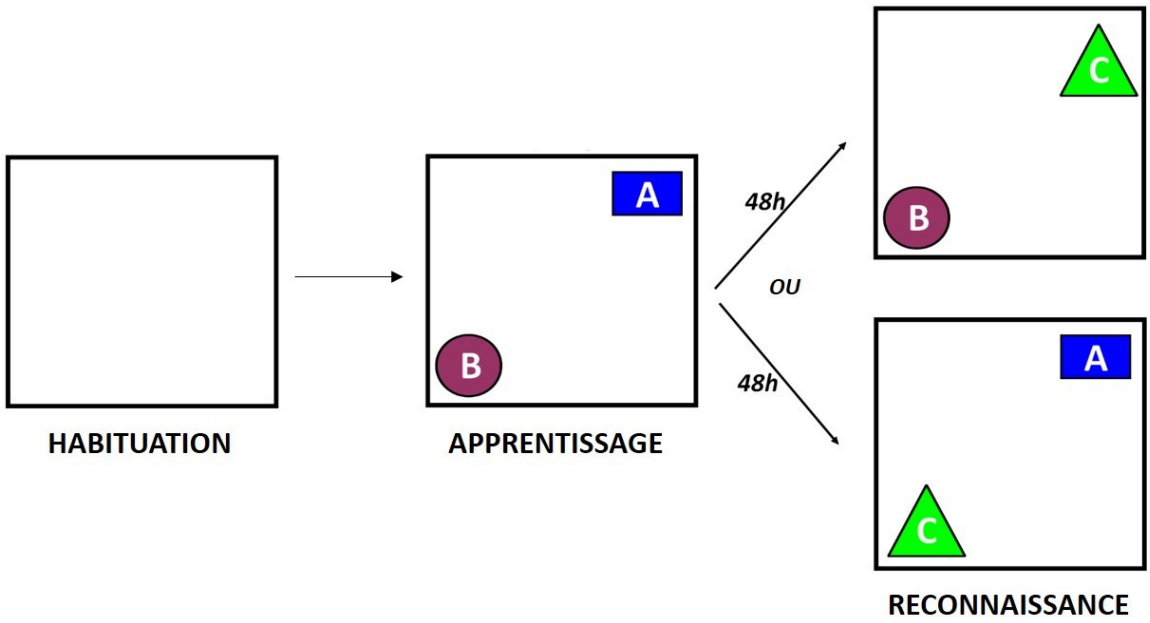


Figure 19 : Déroulement du test de reconnaissance de nouvel objet. Les animaux sont traités 48h avant la phase d'apprentissage.
Source : Deschamps C.

L'ensemble des techniques présentées ci-dessous ont été réalisées en collaboration avec des membres du laboratoire. Pour des informations plus détaillées, je vous invite à vous référer aux sections matériels et méthodes des articles présentés dans la partie résultats.

3- Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel

L'ARN total issu des prélèvements de CA1 a été extrait à l'aide des kits Promega Maxwell RSC Simply RNA Tissue et ReliaPrep^{TM} RNA Miniprep Systems, en suivant le protocole défini par le fournisseur. L'ARN total a été transcrit en ADN complémentaire par la reverse transcriptase et l'expression des transcrits de HDAC2, NR2A, NR2B, TNF-α, IL-1β, IFN-γ et TGF-β a été analysée par PCR quantitative en temps réel, à l'aide de la sonde SYBRGreen et les séquences des amorces sont présentées dans la Table 12. Les transcrits GAPDH ont été utilisés comme gènes de ménage.

	SENS	ANTI-SENS
HDAC2	5'-GGCCTCAGGATTCTGCTACG-3'	5'-GACGGTCATCACGCGATCT-3'
NR2A	5'-TGTGGTGATCGTGCTGAACA-3'	5'-TGAGGTGGTTGTCATCTGGC-3'
NR2B	5'-GTCCTTCAGCGAAGATGGCT-3'	5'-CACATCCGAGGCCACACATA-3'
TNF-α	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-GGGCCATGGAACTGATGAGA-3'
IL-1β	5'-GAGGCTGACAGACCCCAAAA-3'	5'-TGTCGAGATGCTGCTGTGAG-3'
IFN-γ	5'-GCCCTCTCTGGCTGTTACTG-3'	5'-AGAGGAGGCTCTTTCCTTCCA-3'
TGF-β	5'-GCGGACTACTACGCCAAAGA-3'	5'-TGCTTCCCGAATGTCTGACG-3'
GAPDH	5'-GTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	5'-CGACATACTCAGCACCAGCA-3'

Table 12 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR.

4- Western Blot

Les protéines cytoplasmiques issues des prélèvements de CA1 ont été extraites à l'aide d'un tampon Nonidet P40 (NP40) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases, et les protéines nucléaires ont été extraites à l'aide de NP40 + 1% Triton X100. Des quantités

équivalentes de chaque échantillon protéique ont été séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE, transférées sur une membrane en nitrocellulose et incubées avec des anticorps spécifiques contre HDAC2 et GAPDH.

5- Activité HDAC

L'activité HDAC dans les extraits protéiques nucléaires a été mesurée dans l'hippocampe total à l'aide du kit luminescent Promega HDAC-Glo™ I/II Assay and screening system. 1µg d'extrait a été dilué dans 100µL de tampon HDAC-Glo™ I/II dans une plaque 96 puits. La luminescence a été mesurée grâce au lecteur de microplaque Tecan™ 20 minutes après l'ajout du réactif.

6- Cytométrie en flux

Les tissus de CA1 prélevés ont été dissociés pour obtenir des cellules isolées en suspension. La matrice extracellulaire a été digérée enzymatiquement à l'aide du kit Miltenyi Biotec Adult Brain Dissociation et la dissociation mécanique a été réalisée à l'aide d'un gentleMACS dissociator. Les cellules isolées en suspension ont été marquées avec des anticorps spécifiques de NeuN, HDAC2, acH4K12, GluN2A, GluN2B, CD68, CD11b et TLR4, conjugués à des fluorochromes. Les cellules marquées ont été analysées grâce à un cytomètre en flux MACSQuant à l'aide des logiciels MACSQuantify et FlowJo. Cette technique nous a permis de déterminer l'expression de ces marqueurs selon le type cellulaire (neurone ou microglie). Pour quantifier cette expression, nous nous sommes intéressés au pourcentage de cellules exprimant la cible ainsi qu'à l'intensité moyenne de fluorescence.

7- Immunohistochimie

Les cerveaux ont été fixés par perfusion transcardiaque de paraformaldéhyde (PFA) 4% dans 0,1M de PBS (4°C, pH 7,4), sur rat anesthésié au pentobarbital (60mg/kg ; i.p.) et ayant reçu de l'héparine (2500 UI, i.p.). Une fois prélevés, les cerveaux ont été placé dans du PFA 4% toute la nuit puis dans une solution de sucrose 30% pendant une semaine. Les tranches coronales d'hippocampe de 50µm d'épaisseur ont été générées à l'aide d'un cryostat puis stockées à -20°C dans une solution de cryoprotection. Les tranches ont été rincées dans du PBS contenant du Tween 20 et incubées pendant 15 minutes dans une solution composée de méthanol et de péroxyde d'hydrogène afin de supprimer les peroxidases endogènes puis rincées à nouveau au PBS+Tween 20. Les tranches ont été incubées 24h dans une solution de blocage à 4°C puis dans une solution contenant les anticorps primaires puis rincées au PBS et Tween 20 et finalement incubées avec les anticorps secondaires (Table 13). Après rinçage, les lames ont été montées puis les photographies ont été réalisées avec une caméra AxioCam en microscopie confocale en fonction de la zone d'intérêt et finalement analysées en utilisant le logiciel ImageJ.

	Anticorps Iaire	**Dilution**	**Anticorps IIaire**	**Dilution**
Ac-H3	Anti-ac-H3 (Lys9) de lapin	1 :1000	Anti-IgG biotinylé lapin chez le cheval	1 :250
Ac-H4	Anti-ac-H4 (Lys12) de lapin	1 :7500	Anti-IgG biotinylé lapin chez la chèvre	1 :2000
HDAC2	Anti-HDAC2 de lapin	1 :500	Anti-IgG biotinylé lapin chez le cheval	1 :250
NeuN	Anti-NeuN de souris	1 :100	Anti-IgG souris chez la chèvre	1 :250
TLR4	Anti-TLR4 de lapin	1 :50	Anti-IgG lapin chez la chèvre	1 :250
Doublecortin (DCX)	Anti-DCX de souris	1 :750	Anti-IgG souris chez l'âne	1 :250
Vimentine	Anti-Vimentine de souris	1 :1000	Anti-IgG souris chez l'âne	1 :250

GFAP	Anti-GFAP de lapin	1 :1	Anti-IgG lapin chez la chèvre	1 :250
Iba-1	Anti-Iba-1 de chèvre	1 :200	Anti-IgG chèvre chez l'âne	1 :250
Synaptophysine	Anti-synaptophysine de lapin	1 :500		

Table 13 : Liste des anticorps utilisés pour la réalisation des marquages en immunohistochimie.

RESULTATS

La pratique du *binge drinking,* très en vogue chez les adolescents et les jeunes adultes, est caractérisée par l'alternance répétée entre intoxications éthyliques et périodes d'abstinence. Depuis plusieurs années, la communauté scientifique s'interroge sur les effets délétères d'une telle modalité de consommation d'éthanol à un moment où la maturation cérébrale n'est pas totalement achevée. Les avancées scientifiques indiquent que le *binge drinking* constitue un problème majeur de santé publique puisque des atteintes cérébrales structurales et fonctionnelles ont été mises en évidence, tant chez l'humain que dans les modèles animaux et que certaines de ces atteintes pourraient toujours exister à l'âge adulte. Parmi les atteintes fonctionnelles, celles concernant les fonctions cognitives, comme la mémoire et les apprentissages sont régulièrement documentées. Dans ce contexte, au sein du laboratoire, nous avons montré que deux épisodes de type *binge drinking* (3g/kg, i.p., 9h d'intervalle) chez le rat adolescent (P45-55) suffisaient à perturber l'apprentissage des animaux après un délai de 48h dans le test de reconnaissance de nouvel objet. Cette perturbation était accompagnée d'une augmentation de l'amplitude de la PLT et d'une abolition de la DLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe ainsi que de l'augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B (Silvestre de Ferron et al., 2015). Alors que ces résultats soulignent les effets délétères d'un très faible nombre d'expositions à l'éthanol de type *binge drinking* sur l'apprentissage et ses corrélats cellulaires, identifier les mécanismes cellulaires qui sous-tendent ces altérations constitue un enjeu majeur dans l'optique de fournir des avancées dans le traitement de ces altérations. Ainsi, dans un premier article, nous avons étudié l'implication de mécanismes épigénétiques dans les effets des deux épisodes de type *binge drinking*. Dans un second article, nous avons testé l'hypothèse d'une implication neuroinflammatoire dans ces effets et dans un dernier article, nous avons étudié les effets cellulaires des deux expositions à l'éthanol au sein de l'hippocampe, notre région d'intérêt.

Article 1

Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2

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

La littérature scientifique a mis en évidence une implication de l'épigénome dans les effets de l'éthanol sur le fonctionnement cérébral. Ainsi, dans cette étude, nous avons évalué l'implication de mécanismes épigénétiques dans les effets de deux expositions à l'éthanol de type *binge drinking* à l'adolescence. Alors que l'épigénétique regroupe un large panel de modifications, les processus d'acétylation/désacétylation des histones ont été largement étudié, et HDAC2 semble jouer un rôle important dans les processus cognitifs. Ainsi, nous avons mesuré l'activité des histones désacétylases (HDAC), l'expression de HDAC2 et les taux d'acétylation des histones H3 et H4 par des techniques de RT-qPCR, de Western Blot, d'immunohistochimie et de cytométrie en flux. Nos résultats montrent que l'activité HDAC et l'expression de HDAC2 sont augmentées dans l'aire CA1 48h après l'éthanol, alors que l'expression d'Ac-H4 est diminuée. De plus, nous montrons que l'éthanol module la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA aux antagonistes des sous-unités GluN2A et GluN2B, associé à une augmentation de l'expression de GluN2B, sans modification de celle de GluN2A, dans CA1 48h après l'éthanol. De façon intéressante, l'administration de butyrate de sodium (NaB, 600mg/kg, i.p.), un inhibiteur HDAC, 30 minutes avant chaque intoxication éthylique, prévient l'augmentation de HDAC2 et la diminution de Ac-H4 ainsi que les effets délétères de l'éthanol sur les performances d'apprentissage et la DLT dans CA1 y compris les modifications de réponses aux antagonistes des sous-unités du récepteur NMDA.

Nous concluons que deux épisodes de type *binge drinking* chez le rat adolescent induisent des mécanismes épigénétiques responsables des perturbations de la plasticité

synaptique dans CA1 et donc des déficits d'apprentissage, probablement par le biais d'une modulation de l'expression de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA.

Received: 20 July 2018 | Revised: 18 March 2019 | Accepted: 19 March 2019

DOI: 10.1111/adb.12760

ORIGINAL ARTICLE

WILEY Addiction Biology SSA

Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2

Ichrak Drissi | Chloé Deschamps | Grégory Fouquet | Rachel Alary | Stéphane Peineau | Philippe Gosset | Harold Sueur | Ingrid Marcq | Véronique Debuysscher | Mickael Naassila | Catherine Vilpoux | Olivier Pierrefiche

UPJV, INSERM UMR 1247 GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Amiens Cedex 1, France

Correspondence
Olivier Pierrefiche, UPJV, INSERM UMR 1247 GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Chemin du Thil, CHU-Amiens Sud, 80025 Amiens, France.
Email: olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Funding information
Région Hauts-de-France; INSERM

Abstract

Ethanol (EtOH) induces cognitive impairment through modulation of synaptic plasticity notably in the hippocampus. The cellular mechanism(s) of these EtOH effects may range from synaptic signaling modulation to alterations of the epigenome. Previously, we reported that two binge-like exposures to EtOH (3 g/kg, ip, 9 h apart) in adolescent rats abolished long-term synaptic depression (LTD) in hippocampus slices, induced learning deficits, and increased *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor signaling through its GluN2B subunit after 48 hours. Here, we tested the hypothesis of EtOH-induced epigenetic alterations leading to modulation of GluN2B and GluN2A NMDA receptor subunits. Forty-two days old rats were treated with EtOH or the histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaB, 600 mg/kg, ip) injected alone or 30 minutes before EtOH. After 48 hours, 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. LTD and memory were impaired 48 hours after EtOH and NMDA-fEPSP analysis unraveled changes in the GluN2A/GluN2B balance. These results were associated with an increase in histone deacetylase (HDAC) activity and HDAC2 mRNA and protein while Ac-H4K12 labelling was decreased. EtOH increases expression of HDAC2 and mRNA level for GluN2B subunit (but not GluN2A), while HDAC2 modulates the promoter of the gene encoding GluN2B. Interestingly, NaB pretreatment prevented all the cellular and memory-impairing effects of EtOH. In conclusion, the memory-impairing effects of two binge-like EtOH exposure involve NMDA receptor-dependent LTD deficits due to a GluN2A/GluN2B imbalance resulting from changes in GluN2B expression induced by HDAC2.

KEYWORDS

epigenetic, ethanol, long-term depression

Catherine Vilpoux and Olivier Pierrefiche are co-last authors.

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

© 2019 Society for the Study of Addiction

1 | INTRODUCTION

For more than a decade, the effects of drugs of abuse in the central nervous system have been shown to involve epigenetic changes on either histones or DNA.[1,2] Concerning ethanol (EtOH), for example, a study showed in 2004 that chronic EtOH exposure increases expression of the GluN2B NMDA receptor subunit in cortical neurons through DNA demethylation.[3] 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[4] but also ensuring the transmission of EtOH-related pathologies across generations.[5] EtOH-induced epigenetic modifications have also been implicated in the acute effects of EtOH in cerebral cortex[6] or in chronic EtOH exposure during adult life or following intermittent subchronic EtOH exposure during adolescence.[7-10] 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 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression.[10] In rat hippocampal-entorhinal cortex brain slice cultures, EtOH exposure for 96 hours decreases HDAC1/4 activity.[11]

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.[12] 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.[13] Furthermore, NaB treatment reduced motivation to drink EtOH and EtOH consumption in the postdependent–state model of EtOH addiction in rats.[14] Animal treatment with MS-275, an HDACi targeting class I HDAC, reduced motivation to consume EtOH and relapse in heavy drinking rats[15] and reduced binge-like EtOH drinking in mice,[16] revealing that modulation of epigenetic processes with HDACi is capable to decrease EtOH addiction-related phenotype. In this context, it has been proposed that targeting epigenetic processes that modulate synaptic plasticity may indeed yield to novel treatments for EtOH addiction.[8,17,18] Interestingly, among the 18 isoforms of HDAC, the HDAC2 isoform seems to be particularly implicated in the effects of EtOH as EtOH-preferring rats knockdown for HDAC2 in the amygdala showed less anxiety-like behavior and less voluntary EtOH drinking.[19]

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.[20-22] 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 not only in memory consolidation[23,24] but also in memory reconsolidation, being involved in retrieval-dependent memory updating through the regulation of specific molecular and cellular processes.[20] Neonatal exposure to isoflurane, for example, induces long-term memory impairment in mice because of dysregulated histone acetylation in the hippocampus that can be attenuated by the HDACi trichostatin A (TSA).[25] 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,[21] while learning performance in novel object recognition (NOR) test, an hippocampus-dependent task is ameliorated.[26] Other types of learning are also increases after inhibition of HDAC such as inhibitory avoidance in relation with the amygdala.[27]

Binge drinking, a pattern of drinking leading to intoxication in a single short session, is a serious but preventable public health problem.[28] It is the dominant type of alcohol misuse in adolescents and is associated with memory and cognitive impairments in both humans and animals.[29,30] However, whether epigenetic mechanisms are involved in the memory-impairing effects of only few binge drinking episodes remains unclear. In this context, we recently reported that only two exposures to EtOH (3 g/kg, ip, 9 h apart, 2 g/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 hours.[29] 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 excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in the hippocampus. According to the literature, epigenetic appears as a good candidate in explaining the 48-hour 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 HDACi, NaB, to prevent the effects of the two EtOH exposures on synaptic plasticity from acute hippocampus slices, on learning performances with NOR, and on HDAC activity, HDAC2 protein, and mRNA levels as well as 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 and performed flow cytometry and ChIP-qPCR analysis of GluN2A and GluN2B gene promoter to demonstrate HDAC2 regulation in isolated CA1.

2 | 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 no. 2013-118 (French Republic Off. J., 2013), and the local institution ethics committee rules (CREMEAP, University of Picardie Jules Verne).

2.1 | Drugs

EtOH (VWR, Strasbourg, France) was diluted in saline (0.9% NaCl) at 15% (v/v) final concentration and intraperitoneally (ip) injected. NaB (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in saline and administered ip at 600 mg/kg,[14] alone at 8:00 AM and 5:00 PM on day 1, or 30 minutes before each EtOH injections. TSA from Hellobio (UK) was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) (20% dimethylsulfoxide [DMSO]) as stock solution, diluted at final dose in saline (2 mk/kg),[31] and then ip injected. The timeline of treatments and experiments is illustrated in Figure 1.

2.2 | Ethanol and NaB exposure

All experiments were performed on male Sprague Dawley rats during late adolescent period (42-55 d).[32] The timeline of experiments is illustrated in Figure 1. Animals received one of the following treatment: (i) NaCl group: two ip injections of saline at 8:00 AM and 5:00 PM on day 1 (ie, administered 9 h apart) with each injection being preceded by 30 minutes with one ip injection of saline; (ii) EtOH group: two ip injections of EtOH (3 g/kg; 15% v/v),[29] following the same timeline as for NaCl with each injection being preceded by 30 minutes with one ip injection of saline; (iii) NaB group: two ip injections of saline following the same timeline as for NaCl with each injection being preceded by 30 minutes with one ip injection of NaB (600 mg/kg); and (iv) EtOH + NaB group: two ip injections of EtOH (3 g/kg) administered 9 hours apart as for NaCl with each injection being preceded by 30 minutes with one ip injection of NaB (600 mg/kg). All measurements were performed after 48-hour delay.

2.3 | Slices and electrophysiology

Slices and electrophysiology data were obtained as previously described.[29] Briefly, after halothane anesthesia 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, which were stored (>60 min) in carbogen (95% O_2/5% CO_2; pH 7.2–7.4; 28°C) gassed aCSF of the following composition (mM): NaCl 125, KCl 3, NaH_2PO_4 1.25, $CaCl_2$ 2.3, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 25, and 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% to 60% of this maximum. Signals were amplified (grass amplifier, ×1000-2000), 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 milliseconds and delivered 900 times at 1 Hz of pLFS200-900.[33] LTP was induced with 2 × 1-second duration stimulation at 20 Hz, separated by 10 seconds. Plasticity was recorded for 60 minutes. NMDA-fEPSPs were pharmacologically isolated (zero-Mg^{2+} aCSF + 50µM bicuculline + 10µM CNQX, to block GABA-A and AMPA receptors, respectively), and 5µM Ro 25-6981 antagonist was used to test the role of GluN2B subunit and 20nM NVP-AAM077 antagonist for GluN2A subunit.[34,35] At the end of recording, 20µM 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 to 15 minutes of stable baseline recording were used, and measurements were averaged every minute. For electrophysiology, "n" is the number of slices tested and "N" is the number of rats used. Average raw traces either for population spike or for EPSPs were made from 30 to 60 sweeps.

2.4 | Western blot experiments

Ten rats were randomly assigned to control (NaCl, n = 5) or EtOH (n = 5) group. One rat was discarded for technical problems, and

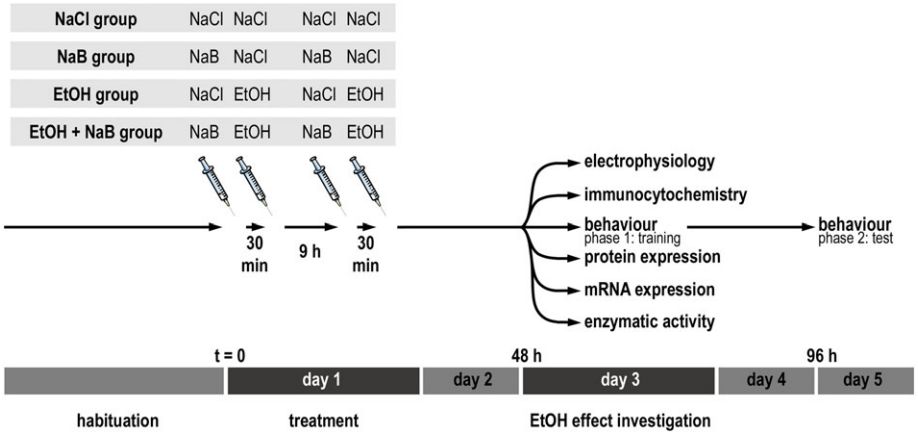


FIGURE 1 Timeline of the experiments

experiment was duplicated for reproducibility. Cytoplasmic proteins of isolated CA1 of hippocampus were extracted with Nonidet P40 (NP40) buffer (1% NP40, 50mM Tris pH 7.5, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 100mM Na_3VO_6, 0.5mM phenylmethanesulphonyl 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, Cambridge, UK and Montigny-le-Bretonneux, France). Blots were developed with the Clarity™ chemiluminescence (ECL) system (Bio-Rad).

2.5 | HDAC activity assay

Ten rats were randomly assigned to control (NaCl, n = 5) or EtOH (n = 5) group. HDAC activity was measured in whole hippocampus using the luminescent HDAC-Glo™ I/II Assay and Screening System (Promega, Charbonnières-les-bains, France). 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 minutes, ie, at maximum luminescence intensity. Experiment was performed in triplicates.

2.6 | RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA of isolated CA1 was extracted using Maxwell®RSC Simply RNA Tissue (Promega), and 5 µg 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′-GTTCAACGG CACAGTCAAGG-3′ Rev 5′-CGACATACTCAGCACCAGCA-3′.

2.7 | 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, ip) plus heparine (2500 UI, ip). Vascular bed was flushed via the ascending aorta with 75 mL of heparinized 0.9% saline and 200 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M PBS (T° 4°C, pH 7.4). Brains were removed, postfixed in 4% PFA overnight, and placed into a 30% sucrose cryoprotection solution for a week. Fifty-micrometer frozen coronal sections of dorsal hippocampus (Bregma −2.80 mm to Bregma −3.60 mm) were obtained with a cryostat and put in cryoprotective solution (ethylene glycol 30%; Sucrose 30%, NaCl 0.9%, in PBS 1×) and stored at −20°C. Floating sections were immunostained for Ac-H3K9, Ac-H4K12, and HDAC2 as previously described.[14] Slides were rinsed in Phosphate buffered saline with Tween-20 (PBST) (PBS 1× [ref 8461.0005, ChemSolute, Brumath, France], 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 1×, bovine serum albumin [BSA] 0.1%, TritonX100 0.2%, Goat serum 2% [Biowest, Nuaillé, France]) followed with, respectively, a rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys9) antibody (Upstate, Lake Placid, New York) diluted (1/1000); a rabbit monoclonal anti-acetyl-histone H4 (Lys12) antibody (Millipore, Guyencourt, France) diluted (1/7500); a rabbit monoclonal anti-HDAC2 antibody diluted (1/500) (ab32117, Abcam). For HDAC2 labelling, heat-mediated antigen unmasking was performed in sodium citrate buffer (sodium citrate 10mM, Tween20, 0.05%, pH 6) for 3 × 30 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, California), and Ac-H4 labellings with biotin-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody 1/2000 (111-065-144 Jackson Immunoresearch, Cambridge, UK). Immunolabelling 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.

2.8 | Flow cytometry analysis

Methods for flow cytometry were adapted from Benoit et al.[36] Isolated CA1 brain tissue was dissociated into single-cell suspensions. The extracellular matrix was enzymatically digested using the Adult Brain Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), while gentleMACS™ Dissociator with heaters was used for mechanical dissociation during the on-instrument enzyme incubation. Single-cell suspension was labelled with FITC-conjugated Ab specific for NeuN (ab190195, Abcam), PE-conjugated Ab for HDAC2 (sc-9959, Santa Cruz), acH4K12 (ab46983, Abcam), biotinylated GluN2A Ab (24405A, Novus), Alexa fluor 647-conjugated Ab for GluN2B (47611AF647, Novus) to flow cytometry analysis. For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, cells were incubated with antibodies in staining buffer (PBS and 2.5% FCS) for 30 minutes and washed. Intracellular HDAC2 and acH4K12 staining were also performed. Cells were subsequently fixed with 1% PFA for 15 minutes at 4°C, permeabilized with 0.1% Triton, 1% BSA in PBS for 30 minutes at 4°C, and then incubated for 30 minutes at 4°C with PE-conjugated anti-HDAC2 or anti-acH4K12 in permeabilization buffer. Labelled cells were analyzed on a MACSQuant cytometer running MACSQuantify software (Miltenyi Biotec) and FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon).

2.9 | ChIP-qPCR experiments

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was performed using high-sensitivity ChIP kit (Abcam) according to the manufacturer's protocol. The antibodies used were as follows: anti-HDAC2 (ab12169) and anti-AcH4K12 (ab46983) from Abcam. After immunoprecipitation, purified ChIP DNA samples were used for RT-qPCR using the following primers: Nr2a Forward 5′-TCACTGCATAGCAA CTGCCT-3′, Reverse 5′-TGGAAGAACGTGGATGTCGG-3′; Nr2b Forward 5′-TGCATCTCGTCAAGACACAAGA-3′, Reverse 5′-CACATC CGAGGCCACACATA-3′. Fold enrichment was calculated to determine interaction of protein to the promoter region using a ratio of amplification efficiency of the ChIP sample over that of nonimmune immunoglobulin (IgG).

2.10 | Novel object recognition

NOR was previously described.[29] 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 hours after the first injection. Rats were transferred to the test room 30 minutes before the experiment. The apparatus was a square box with an open top, made of opaque Plexiglas (45 × 45 × 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-minute habituation, animals were submitted to a 10-minute learning phase with two objects. Test phase was performed 48 hours 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 minutes 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 with the familiar object.

2.11 | Statistics and data presentation

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using SigmaStat® software (LogiLabo, Paris, France). A two-way repeated measure ANOVA was used on raw data for synaptic plasticity and immunohistolabelling experiments. A two-way ANOVA without repetition was used for EPSPs and NOR experiments. Western blot, qPCR, and enzymatic assay were tested with unpaired Student *t* test. Post hoc multiple comparisons were conducted using Tukey test. The data normality was also tested and passed. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3 | RESULTS

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

We first measured synaptic plasticity in CA1 area of acute hippocampus slice 48 hours after treatment as previously described.[29] Concerning LTD, the two-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. LTD magnitude in control group was −40.9 ± 5.5% of baseline values whereas LTD was −18.1 ± 3.6% ($P = 0.001$ between groups) after EtOH. Thus, as reported in our previous study, LTD was strongly reduced after 48 hours (Figure 2A). NaB alone had no effects on LTD since values were not significantly different from the control group (NaCl, −40.9 ± 5.5% vs NaB, −43.2 ± 5.8%, $P = 0.72$; Figure 2B). However, NaB injected as a pretreatment before EtOH prevented significantly the EtOH-induced LTD reduction (Figure 2C). Indeed, LTD magnitude after NaB + EtOH and after EtOH alone reached respectively −31.0 ± 2.3% vs −18.1 ± 3.6% ($P < 0.042$). In addition, LTD magnitude after EtOH + NaB was not significantly different from NaCl level (−31.0 ± 2.3% vs −40.9 ± 5.5%, respectively, $P = 0.06$; Figure 2G). In summary, NaB significantly prevented the effects of EtOH on LTD magnitude without being effective when given alone. Similar results were obtained when TSA was used instead of NaB (see Figure S1).

Concerning LTP, two-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 (Figure 2D and 2H) as already described.[29] Thus, LTP magnitude reached 10.6 ± 4.2% for the NaCl group vs 26.0 ± 4.8% for the EtOH group ($P = 0.013$; Figure 2D and 2H). NaB alone had no effects on LTP as compared with control group (NaB, 3.7 ± 1.6% vs NaCl, 10.6 ± 4.2%, $P = 0.3$; Figure 2E and 2H). When animals were treated with NaB + EtOH, LTP was not significantly altered as compared with EtOH alone (EtOH + NaB, 15.7 ± 4.0% vs EtOH, 26.0 ± 4.8%, $P = 0.09$; Figure 2 F and 2H). In summary, the increased in LTP magnitude observed after EtOH was not prevented by NaB, and NaB alone was not effective.

We previously reported that reduction of LTD following two EtOH binges was not present if recordings were performed after 8 days delay.[29] Here, we tested how long NaB was protective against LTD reduction by EtOH. Recordings after 72 hours showed that LTD was still significantly reduced by EtOH (from −42.3 ± 6.2% in the NaCl group vs −20.8 ± 4.7 after EtOH, $P = 0.02$) and that NaB still prevented the EtOH effects (from −20.8 ± 4.7 after EtOH to −44.8 ± 6.0 after NaB + EtOH, $P = 0.008$; Figure 3A1-A2). Thus, pretreatment with NaB fully restored LTD as compared with the NaCl group (EtOH + NaB, −44.8 ± 6.0 vs NaCl, −42.3 ± 6.2, $P = 0.8$). When recordings were performed 96 hours after the binges, there was no effect of EtOH (NaCl,

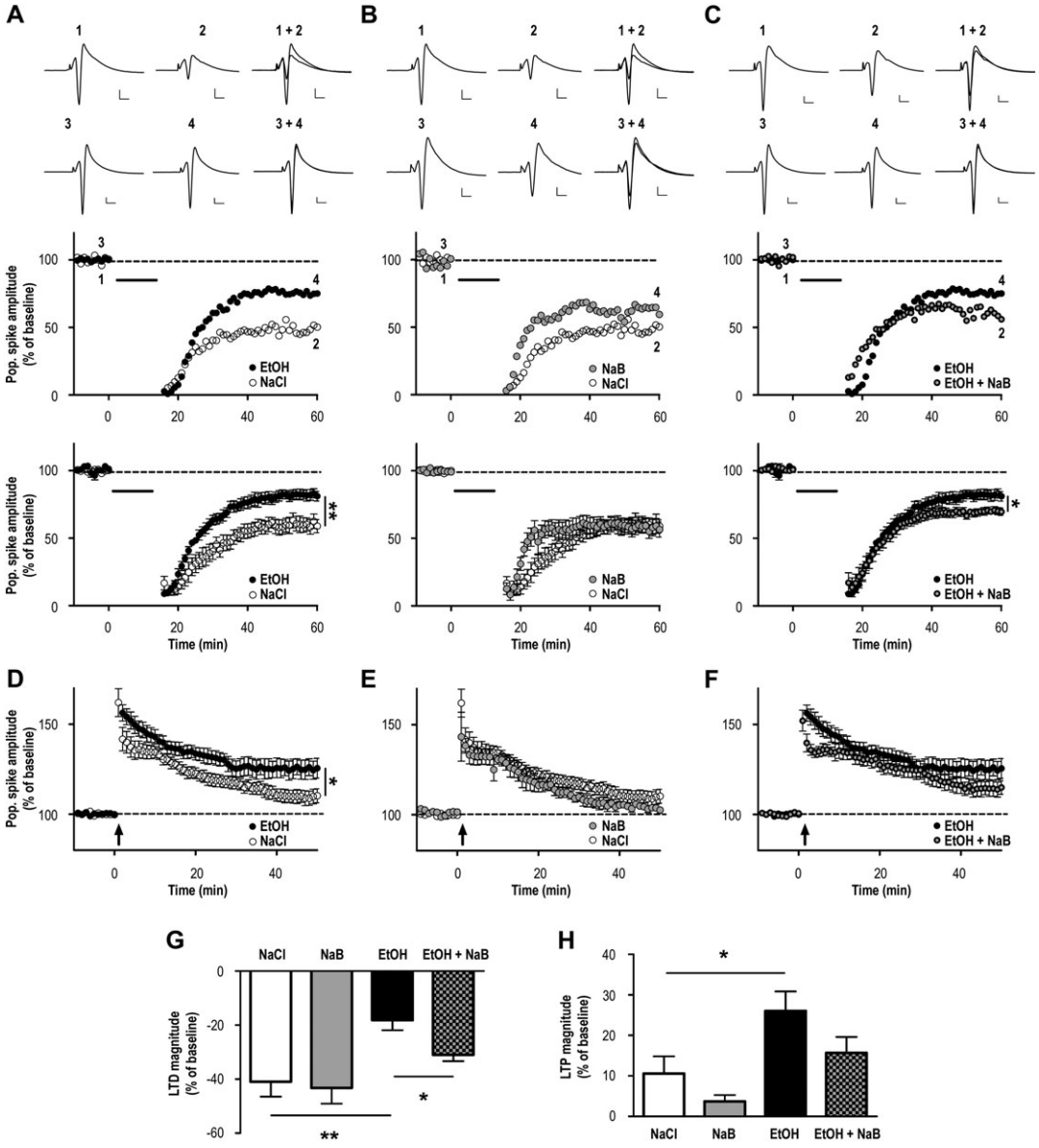


FIGURE 2 Effect of ethanol, NaB, and the combination of both substances on hippocampus synaptic plasticity 48 h after the different treatment. A, Long-term depression (LTD) in control (NaCl) and after ethanol (EtOH). Top traces are averaged signals at time point showed in the graph below. Vertical calibration bar is 0.2 mV; horizontal calibration bar is 5 ms. Below the raw traces is the time course of LTD for the 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 reduced 48 h after EtOH (NaCl n = 7 and N = 5; EtOH n = 7 and N = 5). B, Similar representation to describe the lack of effect of NaB alone (n = 7 and N = 4) on LTD magnitude and time course as compared with NaCl. C, Illustrates the preventing effect of NaB on EtOH-induced inhibition of LTD (EtOH + NaB n = 8 and 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 and N = 5; EtOH n = 6 and N = 5). E, NaB alone had no effect on LTP magnitude and time course (n = 4 and N = 4). F, NaB pretreatment decreased LTP magnitude in a nonsignificant manner (n = 6 and N = 5). G, Summary of the results obtained for LTD. H, Summary for LTP. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$

−42.3 ± 6.2%, EtOH, −39.0 ± 7.4%, $P = 0.7$) and thus NaB pretreatment had no effect compared with the NaCl group (EtOH + NaB, −51.4 ± 3.2% vs NaCl, −42.3 ± 6.2%, $P = 0.3$; Figure 3B1-B2).

3.2 | Sensitivity of NMDA-fEPSPs to GluN2A and GluN2B antagonists

Previously, we reported that NMDA-fEPSP become more sensitive to GluN2B antagonist 48 hours 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, two-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 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, $P = 0.007$; Figure 4A). After NaB alone, the percent of

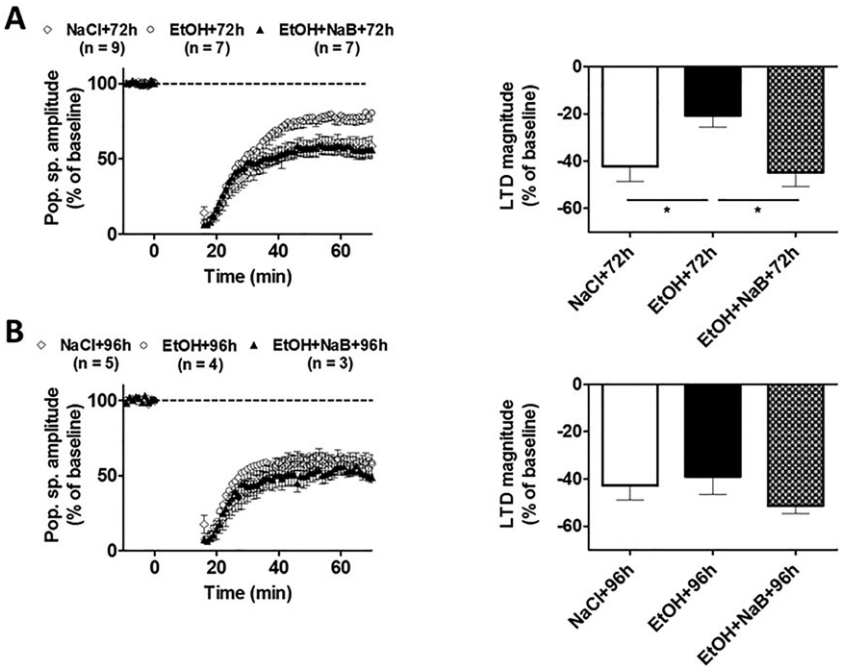


FIGURE 3 Duration of NaB protective effect. A, Long-term depression (LTD) in control (NaCl), after ethanol (EtOH), and after NaB + EtOH treatment (EtOH + NaB) at 72 h delay showing that LTD was still decreased by EtOH and that NaB still prevented this effect (NaCl n = 9 slices from N = 6 animals; EtOH n = 7 and N = 4; EtOH + NaB n = 7 and N = 3). The bar graph shows magnitude of LTD and statistics obtained for the whole experiment. B, Same recordings and experimental conditions but at 96 h delay, showing no effect of EtOH and thus no effect of NaB when combined with EtOH. $^{*}P < 0.05$

inhibition by NVP-AAM077 was similar to that measured in control slices (NaB, −22.5 ± 3.2 vs NaCl, −22.7 ± 3.2%, $P = 0.97$; Figure 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%, $P = 0.05$).

When the GluN2B antagonist Ro-25 6981 was tested on NMDA-fEPSPs, two-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, 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, $P < 0.001$; Figure 4B). NaB alone had no effect on the sensitivity to GluN2B antagonist (NaB, −14.4 ± 3.9% vs control, −9.6 ± 3.7%, $P = 0.378$; Figure 3B) and pretreatment with NaB prevented the effects of EtOH (NaB + EtOH, −17 ± 2.9% vs EtOH, −34.4 ± 3.5%, $P < 0.001$; Figure 3B). In summary, NMDA-fEPSP become less sensitive to GluN2A antagonist and more sensitive to GluN2B antagonist after EtOH and NaB pretreatment prevents significantly these effects of EtOH while NaB alone had no effects.

Furthermore, the input/output curve established for NMDA-fEPSP was shifted leftward 48 hours after EtOH whereas after NaB + EtOH, the curve resumed to control (Figure 4C). In addition, the input/output curve for NaB alone was similar to that of NaCl (Figure 4C). Finally, the Bernstein-Cooper-Munroe (BCM) theoretical curve in our experimental conditions showed that after EtOH, the threshold to induce LTD was shifted to the left as compared with NaCl whereas after NaB + EtOH, it was shifted back to the right, towards the control curve (Figure 4D).

3.3 | 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.[29] Thus, NOR was performed in the four groups of animals following the time line depicted in Figure 1. During training phase and in the presence of two objects A and B, all animals spent 50% of their exploratory time on each object (Figure 5A), 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 (Figure 5B), two-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 (Figure 5C), 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 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%, $P = 0.243$; Figure 5C).

3.4 | Epigenetic changes and the effects of HDACi

Both electrophysiology and behavioral data suggest that two EtOH intoxications trigger epigenetic modifications after 48 hours, at a time

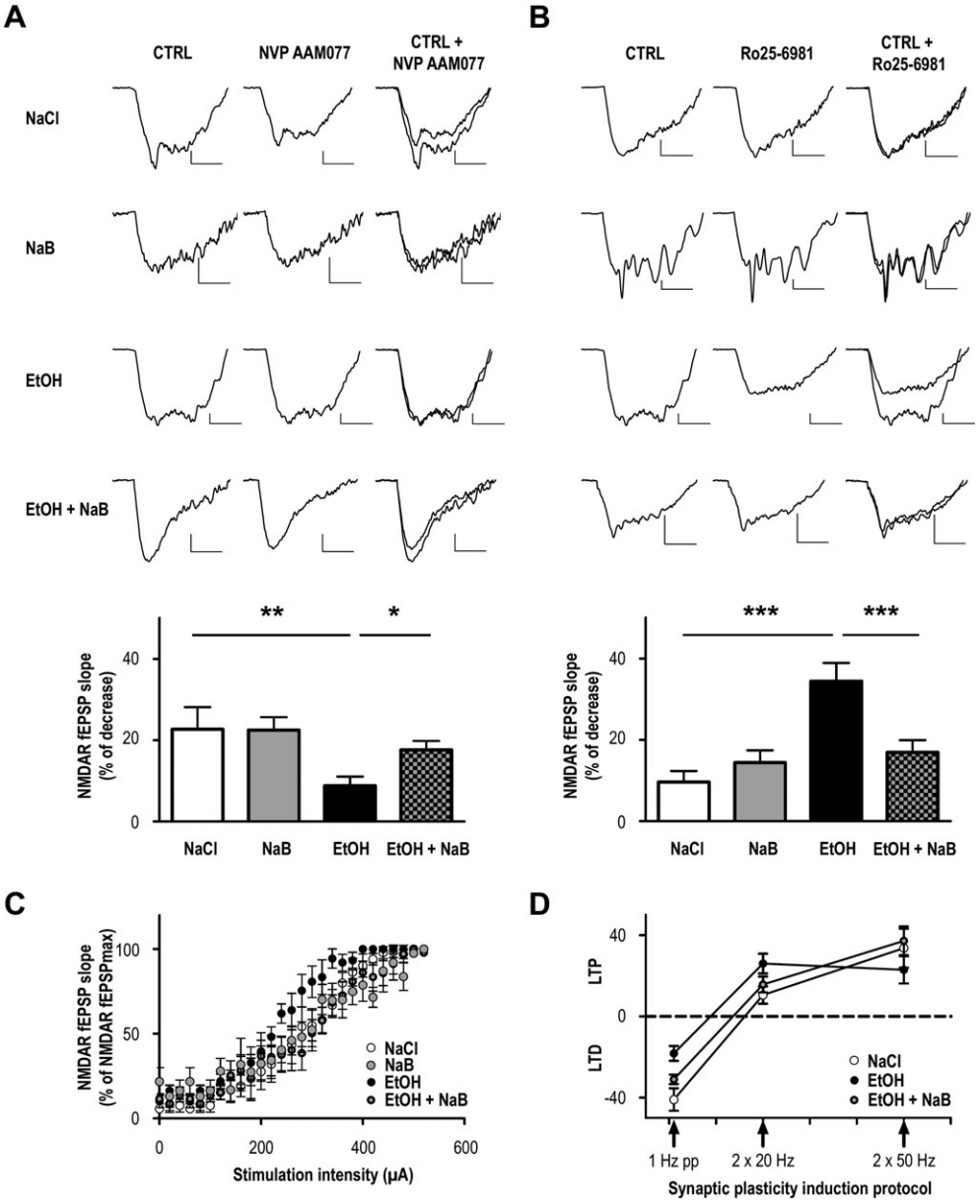


FIGURE 4 NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists, input/output curve, and BCM-like curve. A, Effects of NVP-AAM077, an antagonist of GluN2A subunit on averaged raw traces of NMDA-fEPSPs in different condition as shown on the left: control (NaCl, n = 9 and N = 4), NaB alone (NaB, n = 8, N = 4), EtOH alone (EtOH, n = 8, N = 5), and EtOH + NaB (n = 11 and N = 6). 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; (NaCl, n = 9 and N = 4), NaB alone (NaB, n = 8 and N = 4), EtOH alone (EtOH, n = 8 and N = 5), and EtOH + NaB (n = 14 and N = 6); vertical calibration: 0.02 mV; 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 with control (open dots, NaCl) whereas after EtOH + NaB, the curve resumes to NaCl condition and that NaB had no effect on this relationship (grey dots). D, Bernstein-Cooper-Munro–like curve (BCM) illustrating the capacity to evoke either LTP or LTD as a function of stimulation. Compared with control (NaCl), 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 $^{***}P < 0.001$

when LTD and cognition deficits were detected. Thus, in a first set of experiments, we measured enzymatic activity for the HDAC I/II classes and HDAC2 protein and mRNA levels in NaCl versus EtOH groups (Figure 6) 48 hours after EtOH. The results showed that enzymatic HDAC I/II classes activity in whole hippocampus homogenates was enhanced after EtOH (Figure 6A; NaCl, 28894.6 ± 4909.1 vs EtOH, 36290.3 ± 3997.9, $P < 0.05$). HDAC2 mRNAs (NaCl, 4.5 ± 0.76 vs EtOH, 5.6 ± 0.96, $P < 0.05$; Figure 6B) and HDAC2 protein levels (isoform from the HDAC I family) were also increased after EtOH in isolated CA1 area (NaCl, 0.1 ± 0.22 vs EtOH, 1.4 ± 1.1, $P = 0.05$; Figure 6C). Furthermore, using flow cytometry technic, we found that 48 hours after ETOH, more neurons (NeuN-positive cells) were

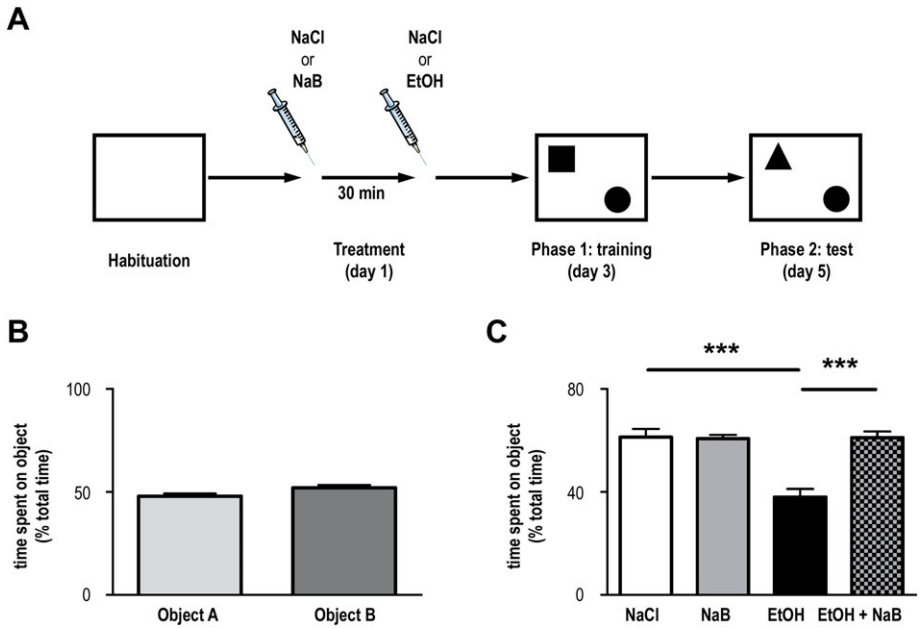


FIGURE 5 Performances in novel object recognition (NOR) task. A, Timeline of the experiment. B, Percent of time spent on each object during training phase showing no difference between object A and B and thus no spontaneous preference. C, Percent of time spent on the novel object during test phase after the 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) alone had no effect whereas administered in addition to EtOH (N = 10), it prevent the effects of EtOH alone. Same statistic labelling as in Figure 2

expressing HDAC2 (Figure 6D). This increase was found in both the percent of cells expressing HDAC2 (NaCl, 59.47 ± 4.22% vs EtOH, 74.10 ± 1.10%, $P < 0.05$) and HDAC2 mean fluorescence intensity (NaCl, 3.15 ± 0.51 vs EtOH, 6.17 ± 0.97, $P < 0.05$; Figure 6E). To go further, we measured the number of HDAC2 immunolabelled cells as well as acetylated-H3 (Ac-H3K9) and -H4 (Ac-H4K12) staining in CA1 area (Figure 7). Concerning Ac-H4K12 (Figure 7A), the two-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 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, 1111.1 ± 52.4, $P = 0.034$) and that NaB alone was devoid of effects on Ac-H4 immunolabelling (NaCl, 1279.2 ± 34.8 vs NaB, 1317.4 ± 63.0, $P = 0.617$; Figure 7A). However, NaB injected as a pretreatment before EtOH prevented the EtOH-induced Ac-H4K12 expression decrease (EtOH, 1111.1 ± 52.4 vs EtOH + NaB, 1333.9 ± 71.2, $P = 0.01$; Figure 7A). Regarding Ac-H3K9, its labelling was unaltered (see Figure S2). Concerning HDAC2 (Figure 7B), two-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 an 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, $P < 0.01$) while NaB alone had no effect ($P = 0.747$). Again, NaB injected as pretreatment prevented the EtOH-induced increase in HDAC2 expression (EtOH, 1228.9 ± 58.2 vs EtOH + NaB, 869.2 ± 57.0, $P < 0.001$).

3.5 | EtOH effects on GluN2A and GluN2B expression levels: role of HDAC2 and prevention by NaB

In order to demonstrate that HDAC2 is involved in the effects EtOH on the expression levels of GluN2A and GluN2B subunits of the NMDA receptor, we combined flow cytometry and ChIP-qPCR technics to isolated CA1. First, RT-qPCR revealed that only GluN2B mRNA levels were increased after EtOH treatment (NaCl, 6.95 ± 0.85 vs EtOH, 8.18 ± 1.10, $P > 0.05$ for GluN2A and NaCl, 0.98 ± 0.04 vs EtOH, 1.14 ± 0.60, $P < 0.05$ for GluN2B; Figure 8A). The number of neurons expressing GluN2B subunit was increased after EtOH and not that of GluN2A subunit (Figure 8B). More specifically, in GluN2A highly expressing neurons, there was no modulation by either EtOH or NaB applied alone or in combination since both the percent of cells expressing GluN2A and mean fluorescence intensity were not altered (Figure 8C left). In contrast, the percent of cells expressing GluN2B was increased after EtOH (NaCl, 45.48 ± 4.88% vs EtOH, 64.68 ± 6.22, $P < 0.05$) and in GluN2B mean fluorescence intensity (NaCl, 1.00 ± 0.11 vs EtOH, 1.99 ± 0.40, $P < 0.05$; Figure 8C right). Importantly, NaB pretreatment decreased EtOH effects on the percent of cells expressing GluN2B and on GluN2B mean fluorescence intensity although not significantly (Figure 8C right) while NaB was not effective when tested alone (NaCl, 45.48 ± 4.88% vs NaB, 49.53 ± 7.23%, $P > 0.05$ and NaCl, 1.00 ± 0.11 vs NaB, 1.18 ± 0.20, $P > 0.05$). Next, we analyzed GluN2A and GluN2B genes promoter enrichment using ChIP-qPCR. Results (Figure 9) showed that there was no enrichment by HDAC2 of GluN2A gene promoter but that

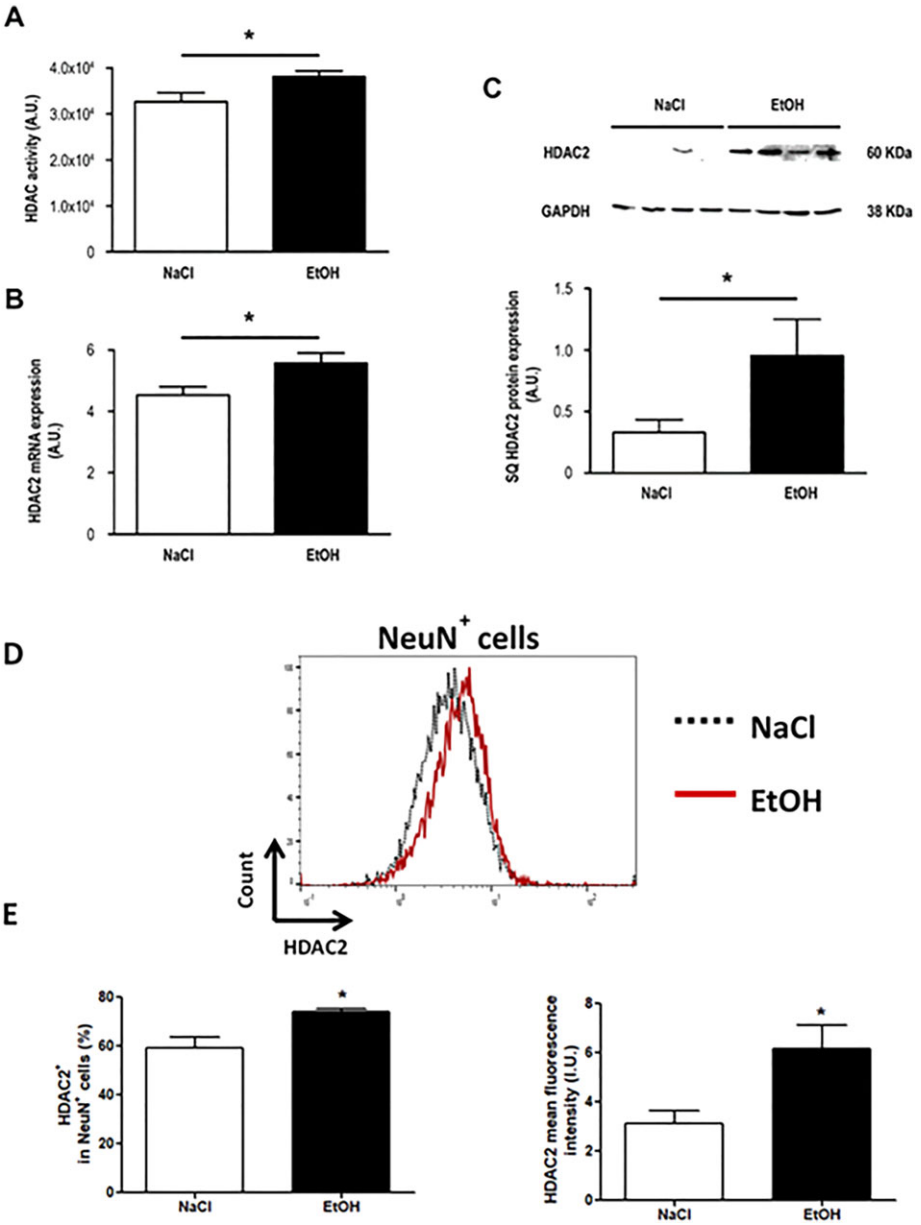


FIGURE 6 HDAC2 protein expression and mRNA levels and enzymatic activity 48 h after two binge. A, Measurement of enzymatic activity for HDAC I and II classes in control (NaCl, N = 9) and EtOH-exposed animals revealed a significant increase 48 h after EtOH (N = 9). B, mRNA levels for HDAC2 in CA1 area 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 ethanol-exposed animals (EtOH, N = 9), relative to GAPDH expression. The bar graph shows that protein level increased 48 h after EtOH exposure. D, Flow cytometry analysis of HDAC2 expression in neuronal cells (NeuN+) of the NaCl group (black line) and of the EtOH group (red line). Overlay reveals that EtOH increases HDAC2+ in neuronal cells. E, Percentage of NeuN-positive cells expressing HDAC2 (HDAC2+) in the NaCl group (white bar) and the EtOH group (black bar) (N = 6) and mean HDAC2 fluorescence intensity in the same groups (N = 6). Same statistic labelling as in Figure 2

GluN2B gene promoter was enriched with HDAC2. Again, this latter effect was prevented by NaB pretreatment.

4 | DISCUSSION

This study confirms and extends our previous work demonstrating that 48 hours after two binge-like EtOH episodes, LTD—a major form of synaptic plasticity related to learning and memory[37]—is significantly reduced in the hippocampus of adolescent rats, leading to learning deficit. Here, we demonstrated that two binge-like 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 demonstrated EtOH-induced upregulation of GluN2B subunit, HDAC2 expression level and activity in the hippocampus with a parallel decrease in the level of Ac-H4, concomitant to LTD abolition and learning deficit. Furthermore, only the GluN2B gene promoter was

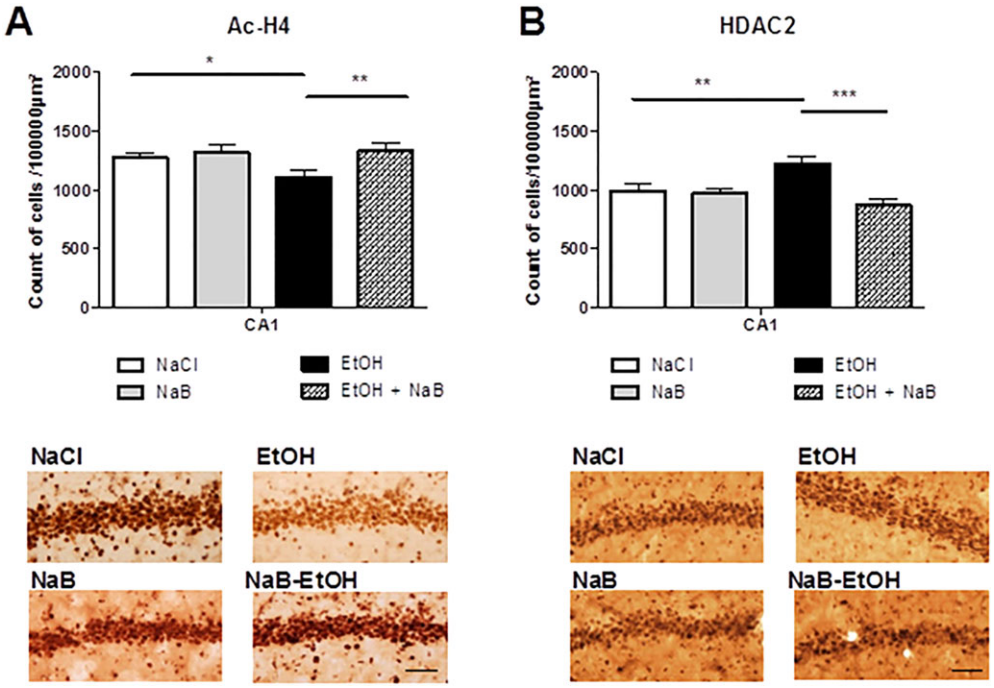


FIGURE 7 Acetylated H4 and HDAC2 immunolabelling 48 h after two binge drinking-like exposures and the effects of NaB. A, Number of cells labeled for acetylated-H4 (Ac-H4) in CA1 areas after the different treatments (location of measurement is shown in Supplementary Figure 3). EtOH reduced the number of cells labelled and this effect was prevented by pre-treatment with NaB. Below the graph are representative photographs of each group. B, Number of cells labeled for HDAC2 in CA1 showing an increase after EtOH and a prevention effect after NaB pre-treatment with representative photographs below. In both cases, NaB tested alone had no effect on the labelling. Calibration bar is 50 µm. Statistic labels are the same as in Figure 2

enriched by HDAC2 after EtOH. Consequently, pretreatment with an HDACi prevented all the effects of EtOH on fEPSPs, LTD, behavior, cellular, and epigenetic effects. Therefore, our results demonstrated that two episodes of EtOH intoxication in adolescent rat disturbed synaptic plasticity in the hippocampus leading to cognitive deficits. Finally, our results clearly demonstrated that the memory-impairing effects of two binge-like EtOH exposures involve NMDA receptor-dependent LTD deficits due to a GluN2A/GluN2B imbalance resulting from changes in GluN2B expression induced by HDAC2.

4.1 | Alterations in epigenetic processes after two 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 hours after the two EtOH exposures. Importantly, expression level of HDAC2, the enzyme that deacetylates histone 4, the number of cells positively labelled for HDAC2, 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 with 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.[38] Several previous studies have shown epigenetic changes after EtOH exposure. For example, 6 hours following 3 g/kg ip 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.[6] Similarly, in the caudate putamen of mice, 1 hour after acute ip 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.[39] Thus, shortly after EtOH treatment, HDAC activity is reduced and acetylated forms of histones are augmented. However, our results were obtained 48 hours after EtOH intoxication, eg, in the absence of plasmatic EtOH.[29] 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.[10] In accordance with these data, we found an increase in HDAC I/II classes activity and a higher HDAC2 expression level, accompanied with a decrease in Ac-H4K12 in CA1. Indeed, epigenetic modulation appears to be region dependent, as well as dependent upon HDAC isotypes and histone isoforms. In this context, differences with other studies may come from the pattern of EtOH exposure, ie, two EtOH exposures vs sub-chronic CIE for 2 weeks and/or from the time point of measurements (48 h vs 50 d, for example). A study performed after 7 days withdrawal from a 10-day binge exposure in C57BL/2J mice showed that acute EtOH administration reduced HDAC activity and upregulated Ac-

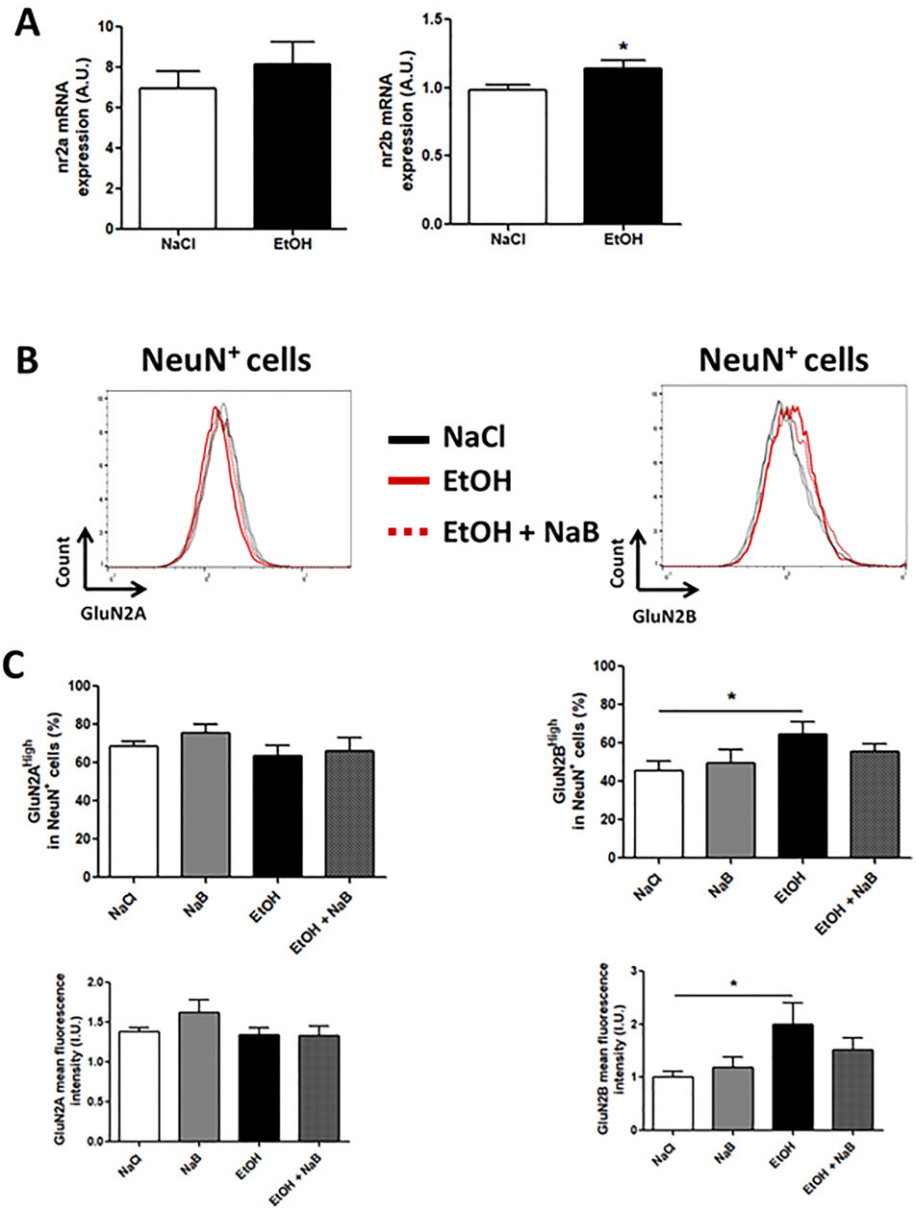


FIGURE 8 Modulation of GluN2B expression in neuronal cells. A, RT-qPCR for nr2a and nr2b, in NaCl (white bar) and EtOH groups (black bar) (N = 6; $^{*}P < 0.05$). B, GluN2A and GluN2B expression analyzed with flow cytometry in neuronal cells (NeuN+). GluN2A expression (left) is not changed after either EtOH (red) or EtOH + NaB (dashed redline) treatment compared with control (NaCl, black) whereas GluN2B expression (right) increased in the EtOH group (red) and is slightly reduced in the EtOH + NaB group (dashed redline). C, Percentage of high-expressing GluN2A cells among the neuronal cells (NeuN+) in the different experimental groups (top left) with corresponding mean fluorescence intensity for GluN2A (bottom left). Similar measurements for GluN2B on the right side. N = 6 in each groups and $^{*}P < 0.05$. Note that only the GluN2B signal (both in % of cells and in mean fluorescence intensity) was positively modulated by EtOH and prevented by NaB pretreatment

H4K12 in the nucleus accumbens proportionally to the decrease of striatal HDAC activity.[12] Altogether, these results suggest a sequential change in different epigenetic markers 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 addition, ChIP-qPCR analysis allowed us to point GluN2B gene promoter as a specific target of EtOH exposure whereas GluN2A gene promoter is not targeted. In total, our study demonstrated that epigenetic regulation of gene expression occurred at short term after only two 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 EtOH-related 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 and the decrease in Ac-H4 labelling were both prevented following NaB pretreatment. Therefore, we may propose that induction of HDAC2 by EtOH participates to the effects of EtOH on synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus.

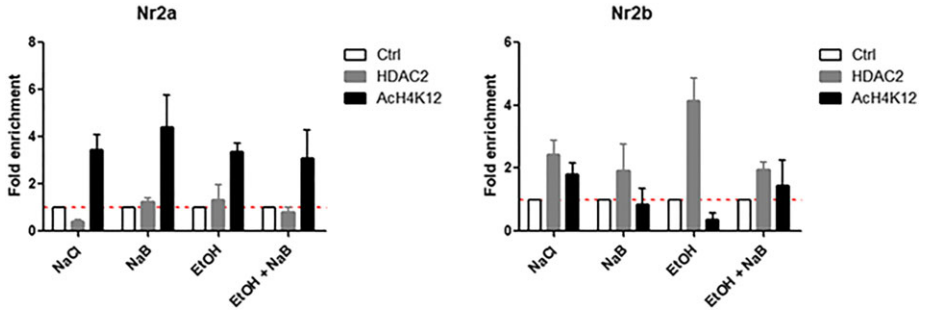


FIGURE 9 ChIP-qPCR assays to evaluate HDAC2 and acH4K12 enrichments on the Nr2a and Nr2b genes promoters in rat CA1 area. A, Results for the Nr2a gene promoter showing that there is no HDAC2 enrichment on this gene promoter in contrast to acH4K12. B, For the Nr2b gene promoter, EtOH increased HDAC2 enrichment on this gene promoter and NaB pretreatment prevented this effect. Moreover, EtOH decreased acH4K12 enrichment on this gene promoter and NaB pretreatment prevented this effect. Nonimmune IgG was used as a negative control. The data are expressed as the mean ± SEM (N = 3)

4.2 | 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 hours after EtOH were prevented by NaB. Importantly, NaB had an effect only when coapplied with EtOH since NaB alone was not effective. It is known that the level of both acetylated histone and HDAC is 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.[38] Conversely, these authors reversed the observed effects using an HDACi while Hdac2 knockout mice did not show such impairment of memory. High levels of HDAC2 have been associated with memory impairment induced by scopolamine[40] or aging,[41] revealing further the involvement of high HDAC2 level 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.[42] Here, we found an increase in HDAC2 expression level 48 hours after EtOH binge associated with cognitive deficits in NOR and with loss of LTD. Our results are thus in accordance with the literature showing that HDAC2 is an important factor mediating epigenetic blockade of synaptic plasticity involved in learning and memory.[38,43] Interestingly, the use of an HDACi targeting HDCA2 was shown to attenuate remote memory (ie, 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.[44] Similarly, in our experimental conditions, LTD was preserved after NaB pretreatment, and this was paralleled by the prevention of cognitive performance in NOR. Noteworthy is the fact that NaB protective effect was visible the time EtOH was effective in decreasing LTD magnitude (ie, for 72 h) and disappeared with the reversibility of EtOH effects. Furthermore, the same prevention effects on LTD were found with TSA, another HDACi, revealing that NaB effects are not related to nonspecific or potential side effects of the drug. In summary, two binges of EtOH during adolescence in rat induced epigenetic changes in the hippocampus associated with synaptic plasticity disturbances and cognitive deficits. However, the link between HDAC2 overexpression and a specific blockade of LTD is lacking at that point. Nonetheless, our measurements of NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists with and without NaB and the use of both flow cytometry and ChIP-qPCR approaches may help understanding the relation between HDAC2, EtOH, and synaptic plasticity in the hippocampus.

4.3 | 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 GluN2A and GluN2B subunits of the NMDA receptor. In control animals, 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 is consistent with the literature indicating a major contribution of GluN2A subunit at adult age than GluN2B subunit in glutamatergic synapses.[45] The results after EtOH confirmed and extended our previous work[29] showing an increase of NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2B antagonist. This effect was furthermore accompanied with a decrease in the sensitivity to GluN2A antagonist. These two observations suggest that GluN2B is particularly sensitive to EtOH modulation and that EtOH also modulates significantly the sensitivity to a GluN2A antagonist. However, such modulation of GluN2B and GluN2A by EtOH was not found at the mRNA levels or in the number of cells expressing those subunits. Indeed, only mRNA levels for GluN2B increased after EtOH as well as the number of cells expressing it whereas GluN2A mRNA levels, expression, and number of cells expressing this subunit were all unaltered. These findings suggest EtOH-induced alterations in NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists through the modulation of GluN2B expression levels only. In this context, the decrease of NMDA-fEPSP sensitivity to GluN2A antagonist was

probably indirect, because of the increase in GluN2B expression. Interestingly, the use of NaB prevented EtOH-induced alteration in NMDA-fEPSP pharmacological sensitivity but also in EtOH-induced increased in the number of GluN2B positive neurons without altering the results for GluN2A. Furthermore, ChIP measurements clearly revealed a modulation of the sole GluN2B gene promoter, which was reversed in the presence of NaB. 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. Thus, 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, GluN2A-to-GluN2B ratio decreased after EtOH compared with control, whereas after NaB + EtOH, this ratio increased towards control level because of the preventive 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 et al.[46,47] Our measurements further support the notion that synaptic plasticity in the hippocampus after EtOH and following EtOH + NaB treatment is controlled by metaplasticity rules (see Figure 4D and also Silvestre de Ferron et al[29]).

However, our results do not take into account that changes measured in our experiments may reflect not only alterations in subunit expression levels but also a reorganization of GluN2B subunit location between synaptic and perisynaptic compartments. Indeed, GluN2B-containing NMDA receptors are highly mobile in the synapse in different conditions.[48] Furthermore, although the level of HDAC2 expression is highly associated with structural plasticity in the hippocampus,[38] 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,[49] suggesting a role for inhibitory transmission in the LTD reduction 48 hours 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 result was that NaB tested alone had no effect on NMDA-fEPSPs sensitivity to the two antagonists, paralleled with lack of effect on learning capability and LTD magnitude and also on number of cells positive for either GluN2B or GluN2A. 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 TSA when it was acutely tested (ie, bath applied) onto the hippocampus slice[21] obtained, furthermore, from relative young animals (21 days old). Cognitive function that has been shown to be improved, notably in NOR, was tested 24 hours after NaB injection.[26]

In conclusion, binge drinking–like exposure to EtOH during adolescence in rats increases GluN2B subunit through the regulation of its gene promoter by HDAC2. This in turn will induce an imbalance with GluN2A subunit in glutamatergic transmission, leading to a blockade of LTD in the hippocampus and to memory impairment.

ACKNOWLEDGEMENTS

I.D. is supported by INSERM and Région Hauts-de-France, G.F. is supported by the French Ministry of Research, S.P. is holder of a Chair of Excellence “Synaptic plasticity” funded by Région Hauts-de-France. We thank Pr Loïc Garçon for giving us access to the flow cytometry technique.

ORCID

Mickael Naassila https://orcid.org/0000-0002-9788-0918
Catherine Vilpoux https://orcid.org/0000-0003-2462-2878
Olivier Pierrefiche https://orcid.org/0000-0003-1427-9332

REFERENCES

1. Brown AN, Feng J. Drug addiction and DNA modifications. *Adv Exp Med Biol*. 2017;978:105-125.
2. Walker DM, Cates HM, Heller EA, Nestler EJ. Regulation of chromatin states by drugs of abuse. *Curr Opin Neurobiol*. 2015;30:112-121.
3. Marutha Ravindran CR, Ticku MK. Changes in methylation pattern of NMDA receptor NR2B gene in cortical neurons after chronic ethanol treatment in mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;121(1-2):19-27.
4. Lussier AA, Weinberg J, Kobor MS. Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics*. 2017;9(3):291-311.
5. Chastain LG, Sarkar DK. Alcohol effects on the epigenome in the germline: role in the inheritance of alcohol-related pathology. *Alcohol*. 2017;60:53-66.
6. Finegersh A, Homanics GE. Acute ethanol alters multiple histone modifications at model gene promoters in the cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(7):1865-1873.
7. Crews FT, Vetreno RP, Broadwater MA, Robinson DL. Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacol Rev*. 2016;68(4):1074-1109.
8. Kyzar EJ, Floreani C, Teppen TL, Pandey SC. Adolescent alcohol exposure: burden of epigenetic reprogramming, synaptic remodeling, and adult psychopathology. *Front Neurosci*. 2016;10:222.
9. Palmisano M, Pandey SC. Epigenetic mechanisms of alcoholism and stress-related disorders. *Alcohol*. 2017;60:7-18.
10. Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, Kokare DM, Crews FT, Pandey SC. 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*. 2016;221(9):4691-4703.
11. Zou JY, Crews FT. Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PLoS One*. 2014;9(2):e87915.
12. Botia B, Legastelois R, Alaux-Cantin S, Naassila M. Expression of ethanol-induced behavioral sensitization is associated with alteration of chromatin remodeling in mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47527.
13. Legastelois R, Botia B, Naassila M. Blockade of ethanol-induced behavioral sensitization by sodium butyrate: descriptive analysis of gene regulations in the striatum. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;37(7):1143-1153.
14. Simon-O'Brien E, Alaux-Cantin S, Warnault V, Buttolo R, Naassila M, Vilpoux C. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate decreases excessive ethanol intake in dependent animals. *Addict Biol*. 2015;20(4):676-689.
15. Jeanblanc J, Lemoine S, Jeanblanc V, Alaux-Cantin S, Naassila M. The class I-specific HDAC inhibitor MS-275 decreases motivation to consume alcohol and relapse in heavy drinking rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(9):pyv029.

16. Warnault V, Darcq E, Levine A, Barak S, Ron D. Chromatin remodeling—a novel strategy to control excessive alcohol drinking. *Transl Psychiatry*. 2013;3(2):e231.
17. Bourguet E, Ozdarska K, Moroy G, Jeanblanc J, Naassila M. Class I HDAC inhibitors: potential new epigenetic therapeutics for alcohol use disorder (AUD). *J Med Chem*. 2018;61(5):1745-1766.
18. Kyzar EJ, Pandey SC. Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neurosci Lett*. 2015;601:11-19.
19. Moonat S, Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Pandey SC. Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism. *Biol Psychiatry*. 2013;73(8):763-773.
20. Jarome TJ, Lubin FD. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2014;115:116-127.
21. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40545-40559.
22. Schmauss C. The roles of class I histone deacetylases (HDACs) in memory, learning, and executive cognitive functions: a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;83:63-71.
23. Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, et al. 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*. 2010;35(13):2521-2537.
24. Federman N, Zalcman G, de la Fuente V, Fustinana MS, Romano A. Epigenetic mechanisms and memory strength: a comparative study. *J Physiol Paris*. 2014;108(4-6):278-285.
25. Zhong T, Guo Q, Zou W, et al. Neonatal isoflurane exposure induces neurocognitive impairment and abnormal hippocampal histone acetylation in mice. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125815.
26. Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S a*. 2009;106(23):9447-9452.
27. Valiati FE, Vasconcelos M, Lichtenfels M, et al. Administration of a histone deacetylase inhibitor into the basolateral amygdala enhances memory consolidation, delays extinction, and increases hippocampal BDNF levels. *Front Pharmacol*. 2017;8:415.
28. Rolland B, Naassila M. Binge drinking: current diagnostic and therapeutic issues. *CNS Drugs*. 2017;31(3):181-186.
29. Silvestre de Ferron B, Bennouar KE, Kervern M, et al. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;19:pyv087.
30. Smith KW, Gierski F, Andre J, et al. Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern. *Addict Biol*. 2017;22(2):490-501.
31. Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci*. 2008;28(14):3729-3737.
32. Schneider M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res*. 2013;354(1):99-106.
33. Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci*. 2000;12(1):360-366.
34. Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 2007;52(1):60-70.
35. Fischer G, Mutel V, Trube G, et al. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of *N*-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1285-1292.
36. Benoit A, Guillamin M, Aitken P, et al. Flow cytometry for receptor analysis from ex-vivo brain tissue in adult rat. *J Neurosci Methods*. 2018;304:11-23.
37. Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(7):459-473.
38. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009;459(7243):55-60.
39. Caputi FF, Palmisano M, D'Addario C, Candeletti S, Romualdi P. Effects of acute ethanol exposure on class I HDACs family enzymes in wild-type and BDNF(+/−) mice. *Drug Alcohol Depend*. 2015;155:68-75.
40. Singh P, Konar A, Kumar A, Srivas S, Thakur MK. Hippocampal chromatin-modifying enzymes are pivotal for scopolamine-induced synaptic plasticity gene expression changes and memory impairment. *J Neurochem*. 2015;134(4):642-651.
41. Singh P, Thakur MK. Histone deacetylase 2 inhibition attenuates downregulation of hippocampal plasticity gene expression during aging. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2432-2442.
42. Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, Pranav H, Monteggia LM. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *J Neurosci*. 2013;33(15):6401-6411.
43. Graff J, Rei D, Guan JS, et al. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*. 2012;483(7388):222-226.
44. Graff J, Joseph NF, Horn ME, et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*. 2014;156(1-2):261-276.
45. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994;12(3):529-540.
46. Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci*. 1982;2(1):32-48.
47. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):383-400.
48. Groc L, Heine M, Cousins SL, et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S a*. 2006;103(49):18769-18774.
49. Hanson JE, Deng L, Hackos DH, et al. Histone deacetylase 2 cell autonomously suppresses excitatory and enhances inhibitory synaptic function in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2013;33(14):5924-5929.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, et al. Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addiction Biology*. 2019;e12760. https://doi.org/10.1111/adb.12760

Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through modulation of HDAC2

Drissi I., Deschamps C., Fouquet G., Alary R., 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.

Supporting information and data

Material and methods

Slices and electrophysiology

Slices and electrophysiology data were obtained as previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). Briefly, halothane anaesthetized animals were decapitated and the brain was immersed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF), then glued into a vibratome (Leica VT1000E, Rueil-Malmaison, France). Slices from dorsal hippocampi (400 µm thick) were cut and stored (> 60 min) in an aCSF reservoir gassed with carbogen (95% O_2/5% CO_2; pH 7.2-7.4; 28°C) and of the following composition (mM): NaCl 125, KCl 3, NaH_2PO_4 1.25, $CaCl_2$ 2.3, $MgCl_2$ 1.3, $NaHCO_3$ 25, glucose 10. Slices to be recorded were transferred to a superfused recording chamber continuously perfused at a rate of 6 ml/min. Electrical stimulation of the Schaffer collateral-commissural afferent pathway was made at 0.033 HZ frequency (square pulse, duration 100 µs) for experiments on LTD and 0.1 Hz for LTP, using a bipolar stimulating electrode (Phymep, Paris, France) and response (field potential) was collected with 3M NaCl (1-3 MΩ) filled glass microelectrodes into the pyramidal cell body layer of CA1 or in the *stratum radiatum*. An input/output relationship was performed to determine the response parameters for each slice. Stimulus strength was increased in 20 µA steps until the maximum

response and the intensity of the test pulses 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. Responses were quantified by measuring population spike amplitude or EPSP slope. LTD was induced with a train of 1 Hz frequency stimulation made of pair of pulses separated by 200 ms and delivered 900 times (pLFS200-900, (Kemp et al., 2000). LTP was induced with 2 stimulations of 1 s duration delivered at different frequencies and separated by 10 s. Plasticity signals were then recorded for 60 min. NMDA-fEPSPs were isolated in a zero-Mg^{2+} aCSF containing 50 µM bicuculline and 10 µM CNQX, to block GABA-A and AMPA receptors, respectively. At the end of recording, 20 µM AP-5 was added to check for the NMDA-dependency of the EPSP. EPSP's slope was measured after the afferent volley and before the full amplitude of the EPSP. Results are expressed as percent change relative to baseline value. The role of GluN2B subunit was assessed using 5 µM Ro 25-6981, a selective antagonist of GluN2B subunit and the role of GluN2A subunit was measured in presence of 20 nM NVP-AAM077, a selective antagonist (Fischer et al., 1997, Bartlett et al., 2007). 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. A maximum of three slices per animal were used.

Western Blot Experiments

Ten rats were randomly assigned to the control (NaCl, n = 5) group or the EtOH group (n = 5). Cytoplasmic proteins of isolated CA1 area 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 Na_3VO_6, 0.5 mM phenylmethanesul- phonyl fluoride (PMSF), 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml leupeptin and 2 mg/ml pepstatin) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). Nuclear proteins of CA1 were extracted with NP40 containing protease and phosphatase inhibitors (Roche) 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), GAPDH (#2118, Cell Signaling Technology). Blots were developed with the Clarity™ chemiluminescence (ECL) system (BioRad).

HDAC activity assay

Ten rats were randomly assigned to the control group (NaCl, n = 5) or the 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

In a first set of experiments, twenty 42 days-old rats were randomly assigned to the CTL group or the EtOH group as described earlier. In a second independent set of experiment, 42 days-old rats (n = 40) were randomly assigned to the NaCl, EtOH, NaB and EtOH-NaB groups. In all experiments, rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg / kg i.p.) and received heparine (2 500 UI, i.p.) to avoid clots formation. Vascular bed was flushed via the ascending aorta with 75 ml of heparinized 0.9% saline then with 200 ml of 4 % iced paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (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 were obtained with a cryostat at the dorsal hippocampus level (Bregma -2,80mm to Bregma -3,60mm) and put in cryoprotective solution (Ethylene glycol 30%; Sucrose 30%, NaCl 0.9%, in PBS 1X) and stored at -20°C.

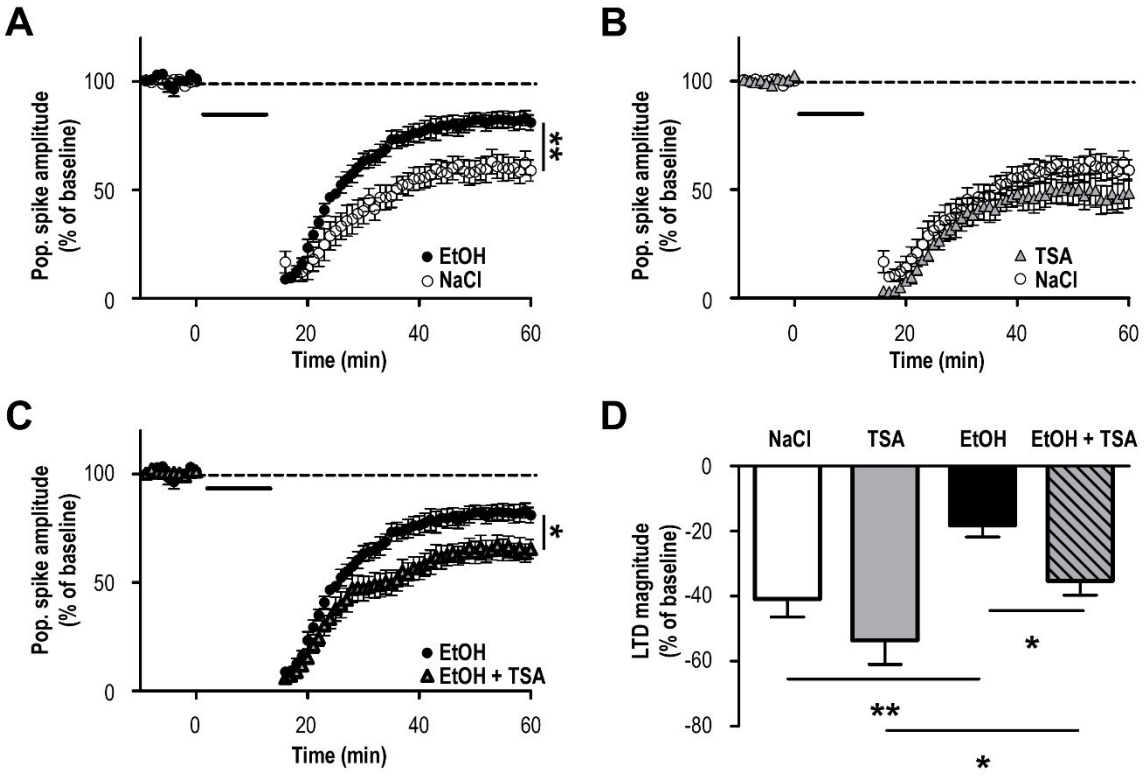
Floating sections were immunostained respectively for Ac-H3K9, ac-H4K12 and HDAC2 as previously described (Simon-O'Brien et al., 2015) as follows : slides were rinsed in PBST (PBS

1X (ref 8461.0005, ChemSolute), 0.2% Triton, pH 7.4) then incubated for 15 minutes with 3% hydrogen peroxide in methanol to quench endogenous peroxidases and rinsed in PBST. The sections were then incubated for 24 hours at 4°C in a blocking solution (PBS 1X, BSA 0.1%, TritonX100 0.2%, Goat serum 2% (Biowest)); respectively with a rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys 9) antibody (Upstate, Lake Placid, NY, USA) diluted (1/1000); with a rabbit monoclonal anti-acetyl-histone H4 (Lys12) antibody (Millipore), diluted (1/7500); with a rabbit monoclonal anti-HDAC2 antibody diluted (1/500) (ab 32117, Abcam). For HDAC2 labelling, heat-mediated antigen unmasking was performed before first antibody incubation, in sodium citrate buffer (sodium citrate 10 mM, Tween20 0.05%, pH6) for 3X30 seconds in microwave. Slides were rinsed in PBST and processed respectively by using the Vectastain ABC Elite kit (SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for Ac-H3 and HDAC2 labelling's; and with biotin conjugated goat anti-rabbit secondary antibody 1/2000 (111-065-144 Jackson Immunoresearch) for ac-H4 labelling. Immunolabeling was visualized using a light microscope connected to a computerized image analysis system Mercator® (Explora Nova, France). All images were acquired using the same light level by using a 20× objective lens, and analyzed by a 'blind' experimenter (unaware of the experimental groups). A basal threshold was established and then applied to the 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 in each of the brain regions recorded and then normalized in areas of 100 000 µm2.

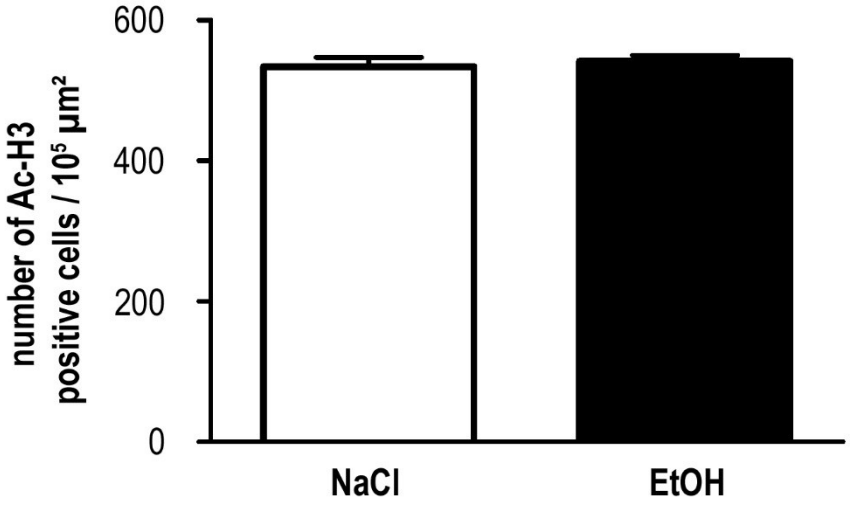
Novel object recognition (NOR)

Method and apparatus were previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). 42 days-old animals (*n* = 40) were allowed to acclimate to the animal care facility and were handled twice a day. One week before experiment, they were i.p. injected with saline once a day and introduced into the test box several times to restrict novelty to the objects and to reduce anxiety. Two extra rats (not included in the behavioural testing), were introduced into the test box for 15 min every day to eliminate extraneous olfactory stimuli. 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 box was furnished with bedding and cleaned between sessions. The objects, also cleaned between sessions, were chosen to avoid any preference but were different enough in shape to be distinguished. They were too heavy to be displaced by rats and were located at the same distance from the wall. Presentation of the objects were counterbalanced: half of the rats were presented the object B as novel whereas the other half were presented the object C as novel. After a 10 min habituation, animals were submitted to a 10 min training phase with two objects in a diagonal configuration. Phase 2 (test) was performed 48 h later by replacing one object by the new object. Digital video acquisition system (Pinnacle Studio HD v.15 software) was used. Off-line analysis consisted in measuring the total exploring time spent on the objects during the first 5 min of recording. We considered all behaviours as 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. Rats displaying low motor activity or low explorative (less than 10 s for both objects) behaviours were excluded. This procedure is a one learning trial, one test trial procedure, allowing assessment of an acute pharmacological treatment on a single learning experience. We evaluated the effect of drugs on the training phase. The forty rats were randomly assigned to

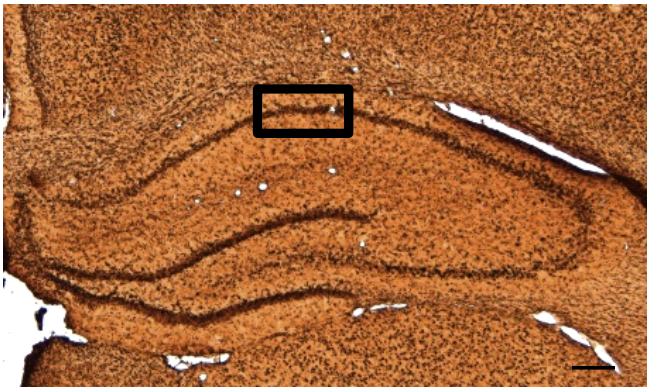
one of the four groups described earlier: NaCl, EtOH, NaB and EtOH + NaB with 10 animals per group. The learning phase took place 48 h after the first injection.



Supporting figure 1. Effect of EtOH, trichostatin A (TSA) an HDACi, and the combination of both on LTD magnitude in CA1 area of the hippocampus. (A) LTD magnitude, expressed as % of baseline recording, in control conditions (NaCl, n =7) and after EtOH treatment (EtOH, n = 7) showing the reduction in LTD by EtOH. **(B)** No effect of TSA (n = 5) tested alone on LTD magnitude and compared to NaCl conditions. **(C)** Pre-treatment with TSA before EtOH (n = 8) administrations restored LTD to NaCl values. **(D)** Summary of the results for the whole populations of slices. Statistical analysis was made via a Two Way RM-ANOVA followed by a post hoc Tukey's test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. The horizontal black bar in A, B and C is the stimulation protocol to induce LTD.



<u>Supporting figure 2.</u> Immunolabelling for Acetylated-H3 in hippocampus CA1 area after EtOH treatment. The two ethanol intoxications had no effect on the number of cells labelled for Ac-H3 in CA1.



<u>Supporting figure 3.</u> Photograph of the hippocampus as seen for immunohistochemistry experiment with a black rectangle located into CA1 area, at the place of measurements

Article 2

Anti-inflammatory drugs prevent memory and hippocampal plasticity deficits following initial binge-like alcohol exposure in adolescent male rats

Deschamps C., Uyttersprot F., Debris M., Marié C., Fouquet G., Marcq I., Vilpoux C., Naassila M., Pierrefiche O.

Outre les mécanismes épigénétiques, la communauté scientifique a mis en évidence la présence d'une neuroinflammation suite à de multiples expositions répétées au *binge drinking*. Ici, nous avons voulu savoir si les processus neuroinflammatoires étaient impliqués dès les premières expositions de type *binge drinking* et s'ils jouaient un rôle dans les perturbations que nous avons précédemment rapportées. Dans ce contexte, nous avons administré *in vivo* différents anti-inflammatoires (la minocycline ; 45mg/kg ; i.p. et l'indométhacine ; 4mg/kg ; i.p.), ou un antagoniste du récepteur TLR4 (TAK-242 ; 3mg/kg ; i.p.) impliqué dans la production de cytokines proinflammatoires, 30 minutes avant chaque intoxication éthylique. Nos résultats montrent que l'administration de minocycline prévient l'ensemble des effets comportementaux et cellulaires induits par l'éthanol qui étaient observés après un délai de 48h. L'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant à une autre famille chimique, confirme cette prévention sur l'abolition de la DLT. En parallèle, nous avons mesuré l'expression de diverses cytokines pro- et anti-inflammatoires en RT-qPCR à 48h dans des aires CA1 isolées et n'avons rapporté aucunes modifications. Cependant, l'étude par immunohistochimie de l'expression du récepteur TLR4 révèle une diminution de son expression dans la population neuronale de l'aire CA1 48h après les deux *binges*. Cet effet est également prévenu par le prétraitement à la minocycline. Ces résultats suggèrent qu'une neuroinflammation transitoire est probablement survenue précocement, ne nous permettant pas de la mesurer à 48h. D'ailleurs, le TAK-242 prévient également l'abolition de la DLT, un élément qui supporte cette hypothèse.

Ce travail suggère que dès les premiers épisodes de *binge drinking* à l'adolescence une neuroinflammation transitoire via le récepteur TLR4 est déclenchée aboutissant à la modulation du rôle de la sous-unité GluN2B pour participer, au final, aux déficits mnésiques observés à distance des alcoolisations.

Psychopharmacology
https://doi.org/10.1007/s00213-022-06112-w

ORIGINAL INVESTIGATION

ANTI-INFLAMMATORY DRUGS PREVENT MEMORY AND HIPPOCAMPAL PLASTICITY DEFICITS FOLLOWING INITIAL BINGE-LIKE ALCOHOL EXPOSURE IN ADOLESCENT MALE RATS

Chloé Deschamps[1] · Floriane Uyttersprot[1] · Margot Debris[1] · Constance Marié[1] · Grégory Fouquet[1] · Ingrid Marcq[1] · Catherine Vilpoux[1] · Mickael Naassila[1] · Olivier Pierrefiche[1]

Received: 28 July 2021 / Accepted: 1 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Rationale Binge drinking during adolescence impairs learning and memory on the long term, and many studies suggest a role of neuroinflammation. However, whether neuroinflammation occurs after the very first exposures to alcohol remains unclear, while initial alcohol exposure impairs learning for several days in male rats.

Objectives To investigate the role of neuroinflammation in the effects of only two binge-like episodes on learning and on neuronal plasticity in adolescent male rat hippocampus.

Methods Animals received two ethanol i.p. injections (3 g/kg) 9 h apart. Forty-eight hours later, we recorded long-term depression (LTD) and potentiation (LTP) in CA1 area of hippocampus slices. In isolated CA1, we measured immunolabelings for microglial activation and Toll-like receptor 4 (TLR4) and mRNA levels for several cytokines.

Results Forty-eight hours after the two binges, rats performed worse than control rats in novel object recognition, LTD was reduced, LTP was increased, and excitatory neurotransmission was more sensitive to an antagonist of the GluN2B subunit of the NMDA receptor. Exposure to ethanol with minocycline or indomethacin, two anti-inflammatory drugs, or with a TLR4 antagonist, prevented all effects of ethanol. Immunolabelings at 48 h showed a reduction of neuronal TLR4 that was prevented by minocycline pretreatment, while microglial reactivity was undetected and inflammatory cytokines mRNA levels were unchanged.

Conclusion Two binge-like ethanol exposures during adolescence in rat involved neuroinflammation leading to changes in TLR4 expression and in GluN2B functioning inducing disturbances in synaptic plasticity and cognitive deficits. Anti-inflammatory drugs are good candidates to prevent brain function and memory deficits induced by few binge-drinking episodes.

Keywords Minocycline · Indomethacin · Ethanol · Long-term depression · TLR4 · TAK-242 · GluN2B

✉ Olivier Pierrefiche
olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Chloé Deschamps
chloe.dschps@gmail.com

Floriane Uyttersprot
floriane.uyttersprot@etud.u-picardie.fr

Margot Debris
margot.debris@etud.u-picardie.fr

Constance Marié
constance.marie@etud.u-picardie.fr

Grégory Fouquet
gregory.fouquet@etud.u-picardie.fr

Ingrid Marcq
ingrid.marcq@u-picardie.fr

Catherine Vilpoux
catherine.vilpoux@u-picardie.fr

Mickael Naassila
mickael.naassila@u-picardie.fr

[1] UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche Sur L'Alcool Et Les Pharmacodépendances, Université de Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Chemin du Thil, 80025 Amiens, France

Published online: 21 March 2022

Introduction

Binge drinking behavior consists in repeated cycles of alcohol intoxication episodes that brings blood alcohol level to 0.08 g/L in 2 h, and abstinence (Rolland and Naassila, 2017; Courtney and Polich 2009; Maurage et al. 2020). This pattern is common practice in adolescents and young adults, while the brain is not mature (Gogtay et al. 2004) and vulnerable to ethanol (Spear 2018). Both clinical and preclinical studies demonstrated memory impairments (Oliveira et al. 2015; Carbia et al. 2017; Smith et al. 2017; Gierski et al. 2020) in adolescent binge drinkers (Nagel et al. 2005), adult heavy drinkers (Beresford et al. 2006) and young adult rats exposed to long sequence of repeated binge drinking (Oliveira et al. 2015; Swartzwelder et al. 2014; Risher et al. 2015). Interestingly, such effects of ethanol have been associated with a smaller hippocampus in young binge drinker (Nagel et al. 2005). Despite the known memory impairments after alcohol exposure, the cellular mode of action of ethanol is not yet fully understood. Moreover, few information is available regarding the consequences of the very first binge drinking episodes, while these episodes might define the fundamental steps leading to long-lasting memory disturbances and/or alcohol addiction in adulthood after a history of binge drinking (Alaux-Cantin et al. 2013; Tavolacci et al. 2019). One of the current hypotheses on the mechanisms of action of ethanol is binge drinking-induced neuroinflammation (Pascual et al. 2018). More precisely, intermittent alcohol exposure for 30 days during adolescence in rat is associated with an increase of TLR4 expression during adulthood notably in the hippocampus and accompanied with cognitive dysfunction (Vetreno and Crews 2015). Postmortem analysis of brain from alcoholic patients indicated the presence of chronic neuroinflammation through increased neuroimmune signaling protein expressions such as Toll-like receptors (TLR) 2, 3 and 4 in the orbitofrontal cortex (Crews et al. 2013). Interestingly, however, one binge drinking episode in humans is associated with a transient increase of TNF-α, a pro-inflammatory cytokine, in the blood 20 min after alcohol consumption (Afshar et al. 2015), suggesting an early and transient inflammation due to binging. Therefore, and in contrast to a chronic state of neuroinflammation measured after a history of binge drinking, it is possible that neuroinflammation is triggered during each intoxication, disappearing during recovery of the subject from alcohol intoxication. Thus, whether the first exposures to ethanol binge induce neuroinflammatory processes that may lead to cognitive deficits, as we previously reported (Silvestre de Ferron et al. 2015), is unclear.

The cellular mechanisms of learning and memory involve bidirectional plasticity in the hippocampus, that is long-term depression (LTD) and long-term potentiation (LTP). These signals can be measured either at the somatic level, revealing changes in cellular excitability, or at the dendritic level demonstrating the modulation of synaptic transmission. Importantly, both somatic and synaptic plasticity accompanied learning (Moser 1995) and modulation of some specific somatic transmembrane currents may affect synaptic function involved in learning and memory (Yang et al. 2014). Furthermore, GABA receptors density is higher at the soma and these receptors are one of the targets of ethanol. Therefore, measuring somatic and synaptic plasticity may inform on the mode of action of ethanol, i.e., whether ethanol preferentially changes cellular excitability or synaptic function as shown for isoproterenol in the CA1 area (Heginbotham and Dunwiddie 1991). Regarding the effect of ethanol, LTP is transiently depressed at both cellular sites after 2-week intermittent ethanol exposure during adolescence (Roberto et al. 2002), whereas nothing is known about LTD. In this context, we previously found that the two first episodes of binge drinking in adolescent rats evoke transient cognitive impairments after 48 h, accompanied with an abolition of somatic LTD in CA1 area of the hippocampus and an increase in LTP. These effects were further accompanied with an overexpression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor (Silvestre de Ferron et al. 2015; Drissi et al. 2020). However, we still do not know if synaptic LTD is abolished and if neuroinflammation is involved in these effects. A role of inflammatory cytokines in ethanol-induced LTD abolition and overexpression of GluN2B is possible. Indeed, neuronal plasticity in the hippocampus is modulated by several chemokines and cytokines such as TNF-α (Maggio and Vlachos 2018), IL-1β (Ikegaya et al. 2003; Nisticò et al. 2013; Hoshino et al. 2017), TGF-β or IFN-ϒ produced by activated microglia (Muñoz et al. 2016; Flood et al. 2019). In addition, other model of neuroinflammation showed an increase in GluN2B subunit (Tang et al. 2020) and inhibiting IL-1β signaling restore NMDA-dependent transmission in some neurodegenerative disease (Bertani et al. 2017). Here, we hypothesize that two binge-like ethanol exposures in adolescent rat disturb the different forms of neuronal plasticity in CA1 area and learning at 48-h delay because of ethanol-induced inflammation. To check this hypothesis, we treated animals with ethanol and anti-inflammatory agents or an antagonist of TLR4 to prevent the effects of ethanol at behavioral and cellular levels in the hippocampus. In addition, we performed immunohistochemistry and biochemical analyses at 48 h to test whether ethanol-induced disturbances involved a long-lasting inflammation.

Materials and methods

Animals and groups

Late adolescent (45–55 days old; Schneider, 2013) male Sprague–Dawley rats received 2 ethanol (EtOH) injections 9 h apart (3 g/kg, i.p.) leading to blood ethanol content (BEC) of ca. 200 mg/dl at 30 min (Silvestre de Ferron et al. 2015; Drissi et al. 2020). We chose the dose of EtOH according to the mean level of BEC measured in French emergency hospital unit. The time between injections was determined considering the higher rate of ethanol metabolization in rodents and the necessity of a period without alcohol between binge episodes (Silvestre de Ferron et al. 2015). We studied only male rats because of the complexity of studying synaptic plasticity and alcohol interactions in female animals as we previously found (Rabiant et al. 2021). Pretreatment with anti-inflammatory-related agents (minocycline, MINO; indomethacin, INDO or TAK-242) was performed 30 min prior to each ethanol administration (Lu et al. 2017; Vetreno et al. 2018) (Fig. 1). We tested control group (4 saline injections), MINO or INDO or TAK-242 group (2 drug + 2 saline injections), EtOH group (2 saline + 2 ethanol injections) and EtOH + MINO or EtOH + INDO, or EtOH + TAK-242 group (2 drug + 2 ethanol injections). Experiments were performed 48 h after the first injection following the European Community guiding principles for the care and use of animals (2010/63/UE, CE Off. J. October 20, 2010), the French Decree N° 2013-118 and the local ethics committee rules (CREMEAP, project N° 3829 and 20,838).

Electrophysiology

We used 118 animals for electrophysiology. The brain of isoflurane anesthetized rats was immersed in a cutting solution (220 mM sucrose, 2 mM KCl, 1.3 mM NaH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 6 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose; pH 7.2–7.4; 4 °C). 400-µm-thick dorsal hippocampus slices were prepared (vibratome Leica VT1200S, Rueil-Malmaison, France) and stored for 2 h at room temperature (RT) in a carbogen (95% O_2, 5% CO_2) gassed artificial cerebrospinal fluid (aCSF) composed of: 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 1.3 mM $MgCl_2$, 2.3 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose; pH 7.2–7.4. The recording chamber was perfused with aCSF (28 ± 1 °C, flow rate: 6 mL/min). The Schaffer collaterals were stimulated using a bipolar tungsten electrode (PHYMEP, France), and signals were recorded with a 3 M NaCl (1–3 MΩ) filled glass microelectrodes placed in the CA1 *stratum pyramidale* or the *stratum radiatum*. For each slice, an input/output relationship determined the maximal response and the test stimulus intensity was set to 50–60% of this maximum. For field excitatory post-synaptic potentials recording (fEPSPs), maximal response was determined at stimulus intensity that evoked a population spike into the EPSP. We measured the amplitude of the population spikes instead of the slope of the initial positive signal (EPSP) because these parameters are not always changed in the same direction (Heginbotham and Dunwiddie 1991) and the slope of the dendritic fEPSPs. All signals were amplified (Grass amplifier, × 1000-2000), filtered (1-3 kHz) and recorded on computer with signal software (CED, Cambridge, UK). LTD was induced with 900 paired stimuli (200-ms interpulse interval) delivered at 1 Hz (pLFS), and LTP was induced with 3 × 1 s stimulation delivered at 33 Hz, or 2 × 1 s stimulation at 50 Hz, spaced by 10 s. LTP and LTD magnitude was expressed as the percentage of change of the response averaged during the last 10 min of recording and compared with the normalized baseline amplitude. NMDA-fEPSPs were recorded in a low-Mg^{2+} aCSF (0.1 mM $MgCl_2$) containing CNQX (15 µM) and (-)-bicuculline methobromide (20 µM), and a GluN2B antagonist was applied (5 µM Ro25-6981). Result was expressed as the percentage of slope inhibition in the presence of Ro25-6981 and was calculated considering the effects of D-AP5 (50 µM), added at the end of recordings as 100% of fEPSP inhibition.

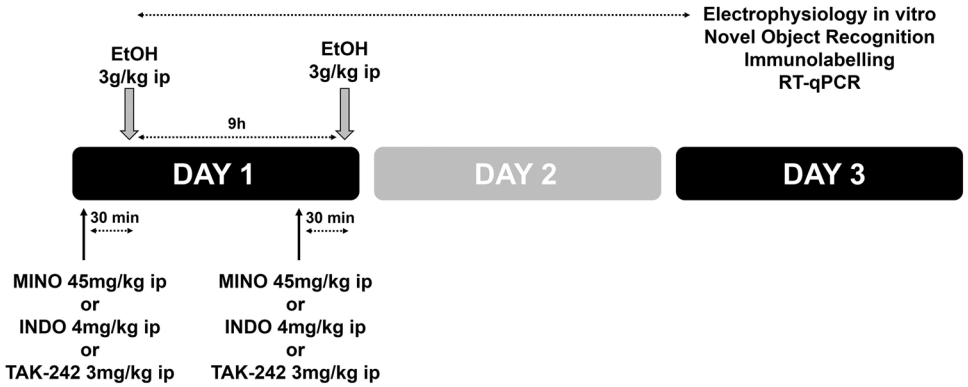


Fig. 1 Timeline for experiments preventing the effects of two binge-like ethanol exposure

Immunohistochemistry and real-time PCR

Rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p.), received heparin (2,500 IU, i.p.) and were transcardially perfused with heparinized 0.9% saline and iced 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Brains were post-fixed in PFA and transferred in a 30% sucrose solution. Coronal Sects. (50 µm) were cut along the anterior–posterior axis of the CA1 at the Bregma and stored at -20 °C in cryoprotective solution (ethylene glycol 30%; sucrose 30%, NaCl 0.9%, in PBS 1X).

Iba1 immunofluorescence Brain floating sections were washed 3 × 5 min with PBS 1x-T (PBS 0.1 M, 0.2% Triton X-100, pH 7.5) and then placed for 1 h at room temperature (RT) in 5% donkey blocking serum (PBS 0.1 M; 0.1% BSA; 0.1% Triton X-100). Sections were incubated at 4 °C for 72 h with primary antibody goat anti-Iba1 diluted 1/200 (ab5076, Abcam). Sections were washed 3 × 5 min with PBS 1x-0,1% Triton X-10 and were incubated for 1 h at RT in AlexaFluor 594 donkey anti-goat secondary antibody (Interchim 705 0.585.147, Interbiotech) diluted 1/250. Following 4 × 5 min washes with PBS 1x, sections were mounted as described previously. For each rat, we analyzed the body cell size and the circularity index of 10 CA1 *stratum pyramidale* microglia taken randomly (N = 8 in each groups).

TLR4 and NeuN immunofluorescence Brain floating sections were washed 3 × 5 min with PBS 1x-T (PBS 0.1 M, 0.2% Triton X-100, pH 7.5), 30 min in methanol with 3% H_2O_2, washed 2 × 10 min in PBS 1x-T and placed in goat blocking serum (PBS 0.1 M; 0.1% BSA; 0.2% Triton X-100; 2% Goat serum, Bio West, Cat nº S2000-100) for 30 min at RT. Sections were incubated at 4 °C for 48 h with primary antibodies rabbit anti-TLR4 (NB56566 Novus bio, France) and mouse anti-NeuN (MAB 377 Merck Millipore), diluted 1: 50 and 1:100 in goat blocking serum, respectively. Afterward, sections were washed 3 × 5 min with PBS 1x-T and incubated for 1 h at RT in AlexaFluor 594 goat anti-rabbit IgG secondary antibody solution (111–585-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories) and AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG secondary antibody (115–545-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories), both diluted 1:250 in a solution of blocking serum of goat (Bio West, Cat nºS2000-100) and horse (Vectastain ABC Kit (Universal) PK-6200). Following 4 × 5 min washes with PBS 1x, sections were mounted on gelatinized microscope slides and lamellae with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) containing mounting solution (Life Technologies Prolong Gold P36931). For each rats, we chose 15 neurons randomly, in the left and the right CA1 *stratum pyramidale,* and measured the immunofluorescence for NeuN and TLR4, and calculated the ratio of the labeling. NeuN immunofluorescence was used as normalization, and the ratio represents TLR4 changes. A z-stack of seven 2-µm adjacent layers with the highest fluorescence intensity was recorded for each field and pooled. Equal sized images were recorded from each tissue section with identical settings for excitation, detection, objective lens, aperture, laser power and photomultiplier gain/offset.

No immunoreactive cells were found when omitting the primary antibody; all photographs were taken with an AxioCam camera using confocal microscopy (Zeiss LSM170) and analyzed using ImageJ software (National Institute of Health, USA) by an experimenter blind to the experimental groups.

For RT-qPCR experiments, total RNA was extracted from isolated CA1 using ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (Promega, Charbonnières-les-bains, France). One microgram of total RNA was reverse transcribed into cDNA with multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). RT-qPCR was performed in triplicate for each sample using SYBR Green Supermix (Promega, Charbonnières-les-bains, France) for 35 cycles with a 3-step program (10 s of denaturation at 95 °C, 15 s of annealing at 60 °C and 20 s of elongation at 72°). Amplification specificity was assessed with a melting curve analysis, and mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001) relative to control values after normalization with GAPDH mRNA. The primers used are presented in Table 1.

Drugs

Ethanol (VWR, Strasbourg, France) was prepared in saline (0.9% NaCl) at a final concentration of 20% according to the Gay-Lussac Table. Minocycline hydrochloride (Hello

Table 1 Primers for SYBRGreen RTqPCR

	Forward	Reverse
HDAC2	5'- GGCCTCAGGATTCTGCTACG-3'	5'- GACGGTCATCACGCGATCT-3'
TNF-α	5'- CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'- GGGCCATGGAACTGATGAGA-3'
IL-1β	5'- GAGGCTGACAGACCCCAAAA-3'	5'- TGTCGAGATGCTGCTGTGAG-3'
IFN-γ	5'- GCCCTCTCTGGCTGTTACTG-3'	5'- AGAGGAGGCTCTTTCCTTCCA-3'
TGF-β	5'- GCGGACTACTACGCCAAAGA-3'	5'- TGCTTCCCGAATGTCTGACG-3'
GAPDH	5'- GTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	5'- CGACATACTCAGCACCAGCA-3'

Bio, UK) was prepared in saline with gentle warming and administered at 45 mg/kg, i.p. (Wang et al. 2015; Haber et al. 2018). Indomethacin (Hello Bio, UK) was prepared in saline containing 2% dimethylsulfoxid (DMSO) and administered at 4 mg/kg, i.p. (Pascual et al. 2007; Vetreno et al. 2018). TAK-242 (Sigma-Aldrich, France) was dissolved in DMSO and diluted in saline (final concentration of DMSO: 1%) and used at 3 mg/kg, i.p. (Pascual et al. 2007; Hwang et al. 2017; Vetreno et al. 2018). 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; Sigma-Aldrich, France) was dissolved in DMSO and used at 15 µM final concentration (final concentration of DMSO: 0,15%); (-)-bicuculline methobromide, D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) and Ro 25–6981 maleate (Hello Bio, UK) were dissolved in distilled water and used at a final concentration of 20, 50 and 5 µM, respectively. IL-1β was prepared in distilled water and bath applied at 30 ng/mL in aCSF containing 1 µg/mL bovine serum albumin (BSA) 30 min before LTD induction (Nisticò et al. 2013).

Novel object recognition

Forty rats were handled every day the week preceding the experiment and were habituated to the experiment room and apparatus 3 times a week. The apparatus was a square box made of opaque Plexiglas (45 × 45 × 45 cm) with an open top under a 30-lux illumination. Learning (phase 1) took place 48 h after treatments, and rats were transferred to the experiment room 30 min prior to the experiment and, then, placed into the arena for 10 min with two objects, A and B, placed at equal distance from the walls and different in form, material, color and too heavy to be moved. We checked for absence of spontaneous preference in phase 1. The apparatus and objects were cleaned between each animal to avoid bias. Recognition (phase 2) was performed 48 h later by replacing one familiar object (A or B) by a new one (object C) in a 5-min session. To counterbalance a possible effect of object A over B, the test was performed with object A as the familiar object in half of the cases, and in the other half, the object B was the familiar object. Digital video acquisition system (Pinnacle Studio HD v.15 software) was used. We measured the total exploration time spent on objects in both phase (sniffing, licking or touching the objects with forelimbs). Analysis was performed on all animals by two independent experimenters who were blind to the experimental conditions. An additional check of the video was done in case of divergence between the two experimenters. Exploration time for an object was normalized and expressed as a percentage of time spent by rats on an object compared with the total exploration time as follows: time spent on novel object (%) = novel object (s) / (novel object (s) + familiar object (s)) × 100. Total exploration time (s) was measured to reveal a potential effect of treatments on animal's global exploratory activity. Animals that did explored both objects for at least 10 s were excluded.

Statistics

All data are expressed as mean ± SEM. For electrophysiology, "n" represents the number of slices and "N" the number of animals. Statistics were conducted using SigmaStat® (LogiLabo, Paris, France). A two-way ANOVA with ethanol and minocycline or indomethacin or TAK-242 as factors was used for electrophysiology, behavior and immunochemistry. Post hoc multiple comparisons were made using a Tukey's test. Learning phase of the NOR and IL-1β effect on LTD was tested with an unpaired Student's t test. We applied a one-way ANOVA to RT-qPCR. We used the Shapiro–Wilk normality test in all case, and if it failed, we used an ANOVA on ranks Kruskal–Wallis test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Ethanol-induced memory impairments are prevented by minocycline pretreatment

In novel object recognition (NOR, Fig. 2), there was no spontaneous preference for the objects during the learning phase since no difference in the percentage of time spent on each object was found (object A: 48.5 ± 1.3%, N = 32 *vs* object B: 51.5 ± 1.3%, N = 32; $P = 0.108$). Furthermore, there was no effect of the treatments on locomotor activity since ANOVA of the total exploration time showed no significant effect of minocycline ($F_{1,30} = 4.065$, $P = 0.053$), of EtOH ($F_{1,30} = 0.0177$, $P = 0.895$) and no interaction ($F_{1,28} = 0.186$, $P = 0.67$; Fig. 2B). During recognition phase (Fig. 2C), a two-way ANOVA showed a significant effect of minocycline ($F_{1,30} = 6.974$, $P = 0.013$), no effect of EtOH ($F_{1,30} = 1.227$, $P = 0.277$) and an interaction between EtOH and minocycline ($F_{1,28} = 6.247$, $P = 0.019$). Post hoc analysis (Tukey's test) revealed no significant difference in the time spent on the novel object between control and minocycline (NaCl: 59.9 ± 1.4%, N = 8 *vs* MINO: 60.2 ± 2.3%, N = 9; $P = 0.918$). However, animals treated with ethanol spent less time exploring the novel object compared with control (EtOH: 52.4 ± 2.63%, N = 6 *vs* NaCl: 59.9 ± 1.4%, N = 8; $P = 0.024$, Fig. 2C). Minocycline increased the percentage of time spent exploring the novel object (EtOH + MINO: 63.15 ± 1.95%, N = 9 *vs* EtOH 52.4 ± 2.63%, N = 6; $P = 0.002$) to a value similar to the MINO group ($P = 0.299$). Regarding the total exploration time for phase 2, a two-way ANOVA revealed a lack of effect of either minocycline ($F_{1,30} = 3.984$, $P = 0.056$), EtOH ($F_{1,30} = 2.464$, $P = 0.128$) or their interaction ($F_{1,28} = 0.059$, $P = 0.81$) (Fig. 2C). In

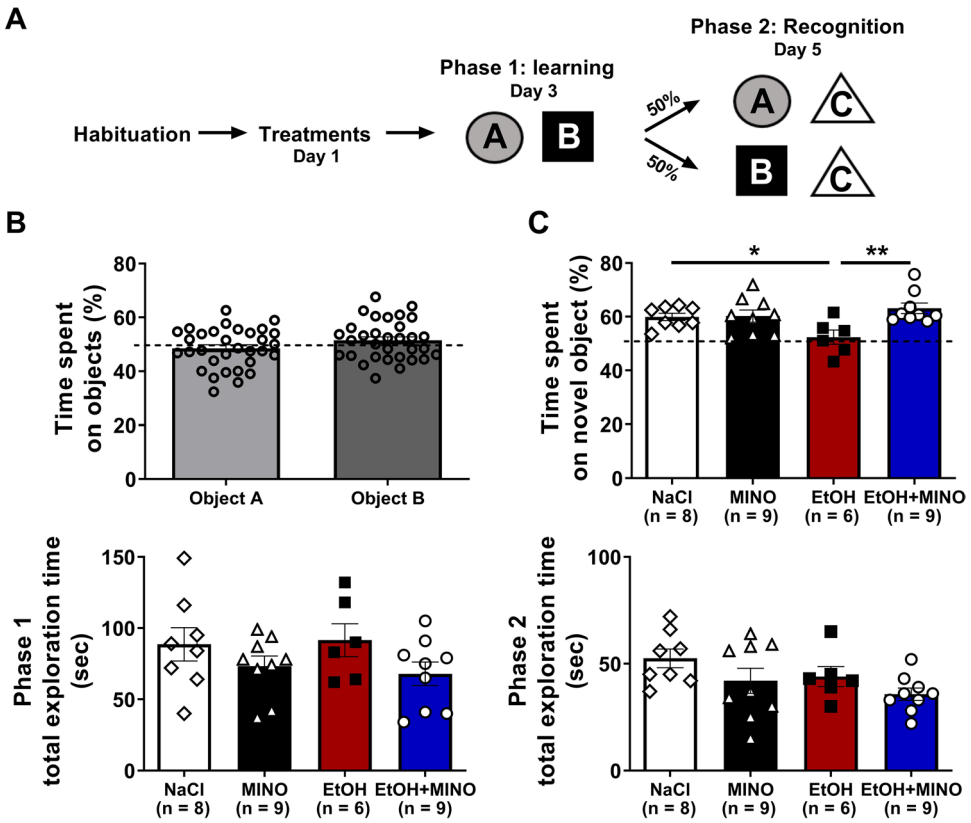


Fig. 2 The effects of ethanol and minocycline on learning capability in novel objet recognition (NOR) task. A) NOR protocol**. B)** Time spent on objects A and B during the learning phase (phase 1) reveals no spontaneous preference for the presented object (N = 32). Below is the total exploration time for each group showing no significant differences between groups. **C)** Top: time spent on the novel objet during recognition phase (phase 2). Ethanol (EtOH)-treated animals spent less time than control (NaCl) animals exploring the novel object. Minocycline (MINO) had no effect on novel object recognition compared to NaCl. Animals who received MINO before EtOH spent similar time on the novel object than NaCl animals. Bottom: total exploration time during phase 2 showing no effects of any treatments. Mean values are given ± standard error of the mean (SEM). N means numbers of animals. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$

summary, learning in NOR is impaired 48 h after two ethanol binge-like episodes and minocycline co-exposure prevented this effect.

Anti-inflammatory agents prevent dendritic LTD abolition after ethanol

We recorded dendritic LTD in the *stratum radiatum*. A two-way ANOVA showed an effect of minocycline ($F_{1,15} = 17.702$, P = 0.001), of EtOH ($F_{1,15} = 8.565$, $P = 0.012$) and an interaction ($F_{1,15} = 14.805$, $P = 0.002$). Post hoc analysis (Tukey's test) revealed an abolition of LTD after EtOH (EtOH:—4.3 ± 2.3%, n = 5, N = 4 *vs* NaCl:—27.2 ± 3.6%, n = 4, N = 3; $P < 0.001$, Fig. 3A1-A2). Minocycline alone had no effect on dendritic LTD (MINO:—28.4 ± 3.6%, n = 4, N = 3 *vs* NaCl:—27.2 ± 3.6%, n = 4, N = 3; $P = 0.808$, Fig. 3A1-A2). Minocycline applied before ethanol increased dendritic LTD compared with ethanol (EtOH + MINO:—31.5 ± 4.1%, n = 4, N = 2 *vs* EtOH:—4.3 ± 2.3%, n = 5, N = 4; $P < 0.001$, Fig. 3A1-A2) and resumed values to minocycline alone (MINO *vs* EtOH + MINO, $P = 0.537$). In summary, 48 h after two ethanol binge-like episodes, dendritic LTD is abolished and minocycline prevented this effect.

Minocycline is an antibiotic with anti-inflammatory properties. To demonstrate further the involvement of inflammation, we tested indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory (Fig. 3B). A two-way ANOVA revealed a significant effect of both indomethacin ($F_{1,29} = 8.349$, $P = 0.008$) and ethanol ($F_{1,29} = 12.451$, $P = 0.002$) and no significant interaction ($F_{1,27} = 3.468$, $P = 0.073$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed a significant reduction of synaptic LTD after ethanol (EtOH:—11.5 ± 4.2%, n = 7, N = 5 *vs* NaCl:—30.7 ± 4.0%, n = 8, N = 4; $P = 0.003$, Fig. 3B1-B2). Like minocycline, indomethacin alone had no effect on LTD compared with control (INDO:—37.4 ± 4.0%, n = 8, N = 3 *vs* NaCl,—30.7 ± 4.0%, n = 8, N = 4; $P = 0.241$, Fig. 3B1-B2). However, it prevented the abolition of synaptic LTD induced by ethanol (EtOH + INDO:—33.3 ± 4.0%, n = 8, N = 4 *vs*

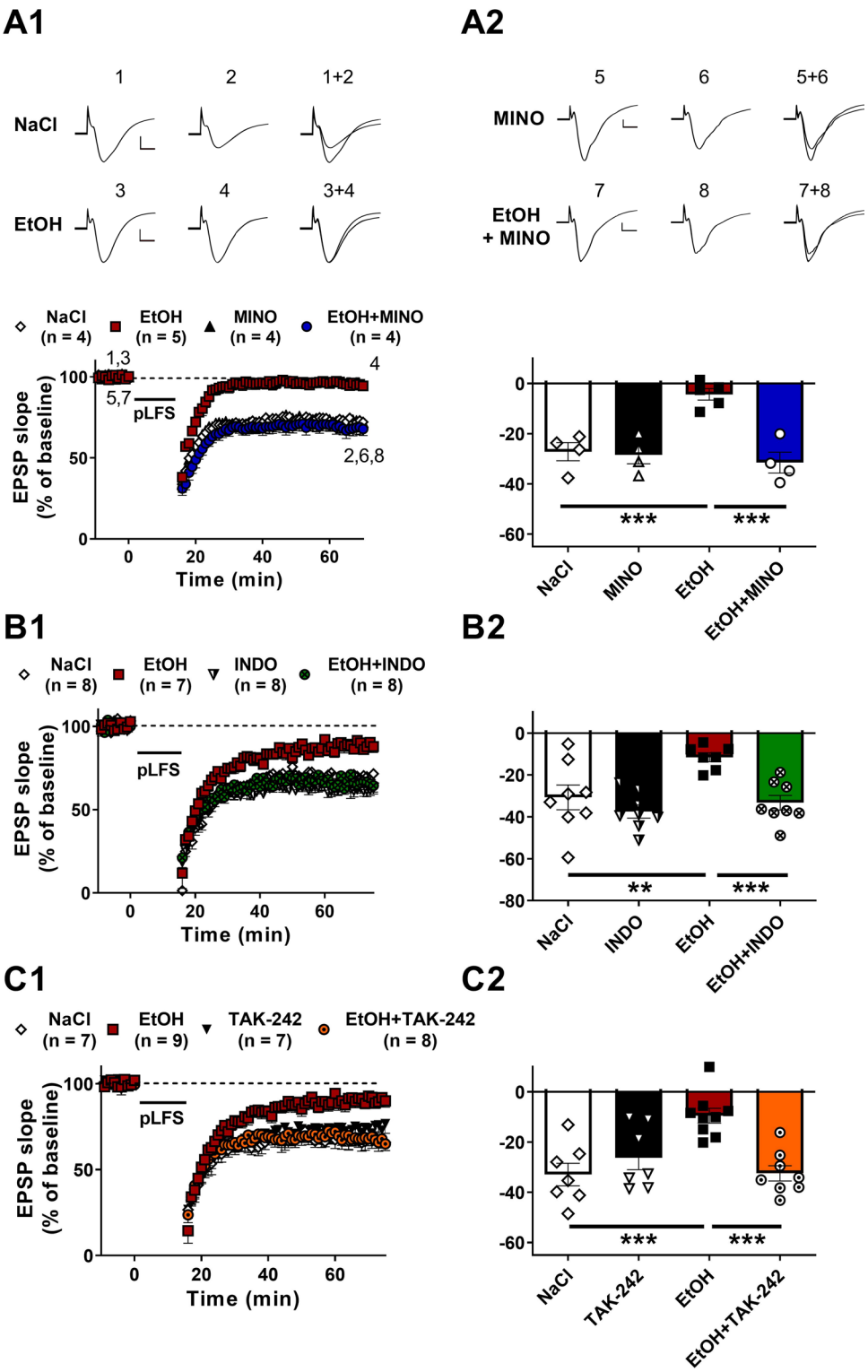


Fig. 3 Ethanol-induced abolition of dendritic LTD is prevented by minocycline, indomethacin and TAK-242. **A1)** Top panel: NaCl and EtOH averaged raw signals during baseline (1, 3) and at the end of the recording (2, 4) (vertical calibration bar: 0.2 mV; horizontal calibration bar: 5 ms). Bottom panel: time course of dendritic long-term depression (LTD) for all slices tested revealing the preventive effect of MINO on EtOH-induced LTD abolition. **A2)** Top panel: MINO and EtOH + MINO averaged raw signals during baseline (5, 7) and at the end of the recording (6, 8) (vertical calibration bar: 0.2 mV; horizontal calibration bar: 5 ms). Bottom panel: bar graph illustrating the LTD magnitude for all groups. **B1)** Preventive effect of INDO on EtOH-induced LTD abolition. **B2)** Bar graph illustrating the LTD magnitude for all groups. **C1)** Prior administration of TAK-242 prevented the LTD disruption induced by EtOH. **C2)** Bar graph illustrating the LTD magnitude for each group. Mean values are given ± standard error of the mean (SEM). n means numbers of slices. Number of animals in A: NaCl, N = 3; MINO, N = 3; EtOH, N = 4; EtOH + MINO, N = 2. In B, NaCl, N = 4; INDO, N = 3; EtOH, N = 5; EtOH + INDO, N = 4. In C, NaCl, N = 3; TAK-242, N = 3; EtOH, N = 7; EtOH + TAK-242, N = 3. $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$

EtOH:—11.5 ± 4.2%, n = 7, N = 5; $P < 0.001$) and resumed values to indomethacin alone (INDO *vs* EtOH + INDO, $P = 0.466$) (Fig. 3B1-B2). In summary, the inhibitory effect of ethanol on dendritic LTD is also prevented by a pretreatment with indomethacin.

In order to investigate further the role of neuroinflammation we administered TAK-242, an antagonist of TLR4 involved in the production of cytokines, 30 min before each ethanol injection. A two-way ANOVA of dendritic LTD (Fig. 3C) revealed a significant effect of both TAK-242

($F_{1,29}=4.658$, $P=0.04$) and ethanol ($F_{1,29}=5.246$, $P=0.03$) and an interaction ($F_{1,27}=15.527$, $P<0.001$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed a reduction of LTD in EtOH slices compared with control (EtOH: -9.5 ± 3%, n = 9, N = 7 *vs* NaCl:—32.9 ± 4.5%, n = 7, N = 3; $P<0.001$, Fig. 3C1-C2). TAK-242 alone had no effect on LTD compared with control (TAK-242: -26.2 ± 4.8%, n = 7, N = 3 *vs* NaCl,—32.9 ± 4.5%, n = 7, N = 3; $P=0.239$, Fig. 3C1-C2). However, TAK-242 prevented the reduction of synaptic LTD after ethanol (EtOH + TAK-242: -32.4 ± 3%, n = 8, N = 3 *vs* EtOH: -9.5 ± 3%, n = 9, N = 7; $P<0.001$) and resumed values to TAK-242 alone (TAK-242 *vs* EtOH + TAK-242, $P=0.26$; Fig. 3C1-C2). Hence, pretreatment with TAK-242 prevents LTD abolition induced by ethanol.

Minocycline also prevents the effects of the two binge on hippocampus somatic plasticity

We further wished to check whether ethanol exposure altered similarly dendritic and somatic LTD since the latter reflects excitatory level of pyramidal neurons mainly determined by a balance between glutamatergic excitations and GABAergic inhibitions, the two major targets of ethanol. Regarding LTD (Fig. 4), a two-way ANOVA revealed a lack of effect of minocycline ($F_{1,36}=2.711$, $P=0.109$), an effect of EtOH ($F_{1,36}=9.021$, $P=0.005$) and an interaction ($F_{1,34}=5.13$, $P=0.03$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed a smaller LTD after ethanol (EtOH: -17.2 ± 4.2%, n = 12, N = 6 *vs*

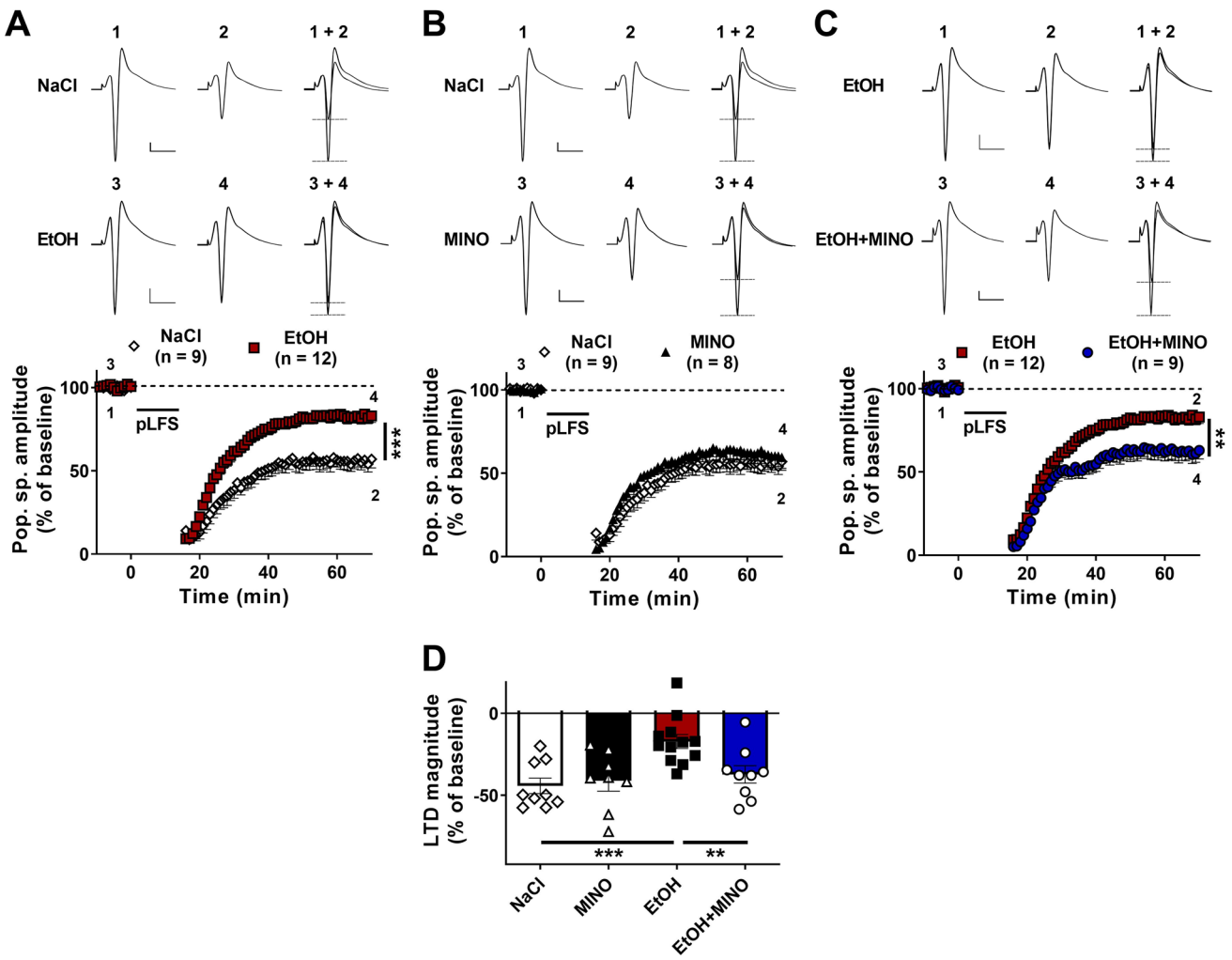


Fig. 4 Minocycline prevents somatic LTD depression after ethanol. Top panel: averaged raw signals during baseline (1,3) and at the end of the recording (2, 4) (vertical calibration bar: 0.2 mV; horizontal calibration bar: 10 ms). Middle panel: single slice recording corresponding to the above averaged signals. **A)** LTD was significantly decreased in ethanol (EtOH) slices (N = 6, n = 12) compared with control (NaCl, N = 6, n = 9). **B)** Minocycline (MINO, N = 5, n = 8) had no effect on somatic LTD. **C)** Prior administration of MINO (EtOH + MINO, N = 5, n = 9), prevented LTD abolition by EtOH. **D**) Bar graph for LTD magnitude in each condition. Mean values are given ± standard error of the mean (SEM). n means numbers of slices. $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$

NaCl: -44.2 ± 4.8%, n = 9, N = 6; $P < 0.001$, Fig. 4A). Minocycline alone had no effect on LTD compared with control (MINO: -41 ± 6.4%, n = 8, N = 5 *vs* NaCl: -44.2 ± 4.8%, n = 9, N = 6; $P = 0.679$, Fig. 4B). When minocycline was administered before ethanol (EtOH + MINO group), LTD reached -37.3 ± 5.3% (n = 9, N = 5, Fig. 4C-D), a value similar to LTD in the MINO group ($P = 0.621$) and greater to the EtOH group ($P = 0.006$). In summary, minocycline prevents the inhibitory effect of two ethanol binge-like episodes on somatic LTD at 48-h delay.

Regarding somatic LTP, we previously found that the two-ethanol binge-like exposures altered the threshold to induce LTP (Silvestre de Ferron et al. 2015). Here, we checked whether minocycline also prevented this effect. For this purpose, we tested two different high-frequency stimulation (HFS) in order to elaborate a BCM-like curve (Bienenstock-Cooper-Munro; Fig. 5). When LTP was triggered with HFS 3 × 33 Hz (Fig. 5A), a two-way ANOVA revealed no effect of minocycline ($F_{1,18} = 2.774$, $P = 0.115$), an effect of EtOH ($F_{1,18} = 8.193$, $P = 0.011$) and no interaction ($F_{1,16} = 2.729$, $P = 0.118$). Post hoc analysis (Tukey's test) indicated similar LTP magnitude between control and minocycline alone (NaCl: 17.4 ± 5.5%, n = 5, N = 4 *vs* MINO: 17.4 ± 3.4%, n = 5, N = 4; $P = 0.993$). In contrast, 48 h after the two binge, LTP magnitude was increased compared with control (EtOH: 34.8 ± 1.6%, n = 5, N = 3 *vs* NaCl: 17.4 ± 5.5%, n = 5, N = 4; $P = 0.006$). Interestingly, administration of minocycline before ethanol decreased

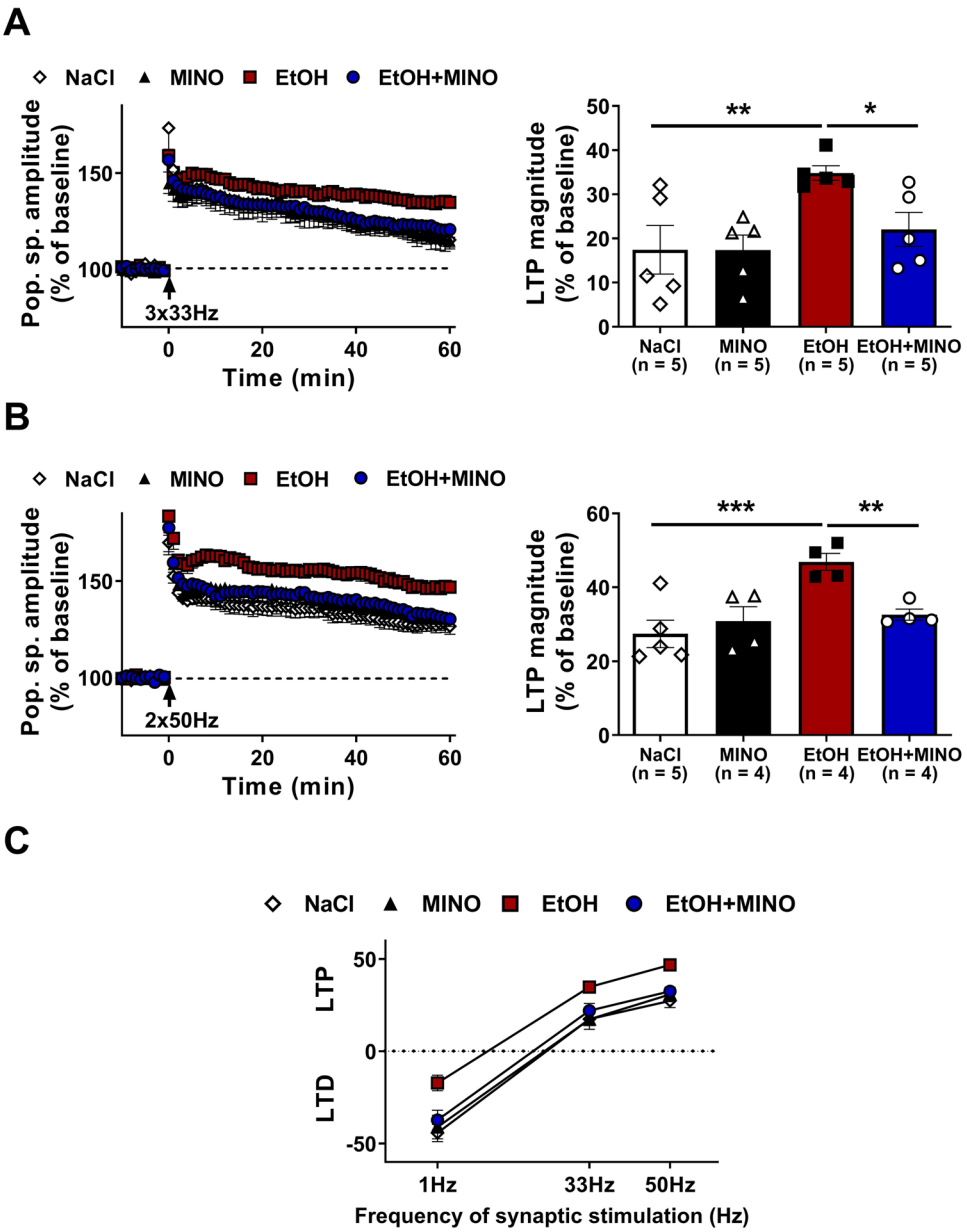


Fig. 5 Minocycline prevents the effects of ethanol on LTP and on the threshold for bidirectional plasticity. A) Left: time course of LTP induced by HFS 3 × 33 Hz for each treatment. Right: bar graph showing LTP magnitude in the different conditions. Minocycline (MINO, N = 4, n = 5) alone had no effect on LTP compared with control (NaCl, N = 4, n = 5). Ethanol (EtOH, N = 3, n = 4) significantly increased LTP and prior administration of MINO (N = 3, n = 5) prevented this effect. **B)** Similar representation for LTP induced with HFS 2 × 50 Hz. MINO (N = 3, n = 4) alone had no effect on LTP. EtOH (N = 3, n = 4) increased LTP and prior administration of MINO (N = 2, n = 4) prevented this effect of EtOH. **C)** Bernstein–Cooper–Munro (BCM) curve indicating the ability of neurons to trigger LTP or LTD according to the frequency of stimulation (Hz). The curve for EtOH was shifted to the left compared with NaCl while that for MINO was similar to NaCl group. Thus, MINO pretreatment brought back the curve to control. Mean values are given ± standard error of the mean (SEM). n means numbers of slices. *$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$

LTP as compared to ethanol (EtOH + MINO: 22 ± 3.9%, n = 5, N = 3 *vs* EtOH: 34.8 ± 1.6%, n = 5, N = 3; $P = 0.032$) and resumed values to minocycline alone (MINO *vs* EtOH + MINO, $P = 0.405$). When we tested HFS 2 × 50 Hz (Fig. 5B), a two-way ANOVA revealed no significant effect of minocycline ($F_{1,15} = 2.96$, $P = 0.109$), a significant effect of EtOH ($F_{1,15} = 11.393$, $P = 0.005$) and an interaction ($F_{1,13} = 7.959$, $P = 0.014$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed no difference in LTP magnitude between control and minocycline (NaCl: 27.4 ± 3.7%, n = 5, N = 4 *vs* MINO: 30.8 ± 3.9%, n = 4, N = 3; $P = 0.438$). Here again, EtOH induced an increase of LTP compared to control (EtOH: 46.9 ± 2.3%, n = 4, N = 3 *vs* NaCl: 27.4 ± 3.7%, n = 5, N = 4; $P < 0.001$). In this condition too, administration of minocycline before ethanol reduced LTP compared with ethanol alone (EtOH + MINO: 32.6 ± 1.5%, n = 4, N = 2 *vs* EtOH: 46.9 ± 2.3%, n = 4, N = 3; $P = 0.008$) and with no difference with minocycline alone (EtOH + MINO *vs* MINO, $P = 0.709$). After ethanol, the BCM-like curve is shifted to the left (Fig. 5C) revealing a change in the threshold for LTP versus LTD. In the presence of minocycline, the curve in the presence of ethanol resumes to the control curve. In summary, somatic LTP is increased 48 h after two ethanol binge-like episodes and LTD is decreased. Minocycline alone had no effect but prevented the effects of ethanol on LTP, LTD and on the left shift of the threshold for bidirectional plasticity.

Anti-GluN2B agent is more effective 48 h after the initial binge

In previous studies, the two ethanol binges increased the sensitivity of NMDA-fEPSPs to an antagonist of the GluN2B subunit of the NMDA receptor at 48-h delay. We thus tested whether an anti-inflammatory was able to prevent this effect. NMDA-fEPSPs were pharmacologically isolated in CA1, and its sensitivity to a GluN2B antagonist was assessed with bath application of 5 µM Ro25-6981 (Fig. 6). A two-way ANOVA showed no significant effect of both minocycline ($F_{1,29} = 0.788$, $P = 0.383$) and ethanol ($F_{1,29} = 2.324$, $P = 0.139$) but a significant interaction between minocycline and ethanol ($F_{1,27} = 5.004$, $P = 0.034$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed that NMDA-fEPSPs sensitivity to Ro25-6981 was higher in EtOH slices compared with control (EtOH: 31.4 ± 3%, n = 8, N = 6 *vs* NaCl: 19.2 ± 3.7%, n = 8, N = 7; $P = 0.012$, Fig. 6A-B). Minocycline alone had no effect on NMDA-fEPSPs sensitivity to Ro25-6981 compared with control (MINO: 23.6 ± 3.2%, n = 7, N = 4 *vs* NaCl: 19.2 ± 3.7%, n = 8, N = 7; $P = 0.357$). However, when minocycline was administered before ethanol (EtOH + MINO), NMDA-fEPSPs sensitivity to Ro25-6981 was decreased compared with EtOH (EtOH + MINO: 21.2 ± 3%, n = 8, N = 5 *vs* EtOH: 31.4 ± 3%, n = 8, N = 6; $P = 0.033$, Fig. 6B). These latter values resumed to MINO alone (EtOH + MINO: 21.2 ± 3%, n = 8, N = 5 *vs* MINO: 23.6 ± 3.2%, n = 7, N = 4; $P = 0.624$). Thus, 48 h after two ethanol binge-like episodes, NMDA-fEPSPs sensitivity to a GluN2B antagonist was increased and minocycline prevented this effect.

Bath application of IL-1β block synaptic LTD

The fact that anti-inflammatory agents prevent the effects of ethanol on learning and on hippocampus plasticity measured at 48-h delay suggests that circulating cytokine at this time point may be responsible for the blockade of synaptic LTD. In order to check this assumption, we measured whether bath applied IL-1β (or BSA; bovine serum albumin, the solvent) blocked synaptic LTD on hippocampus slices from naïve

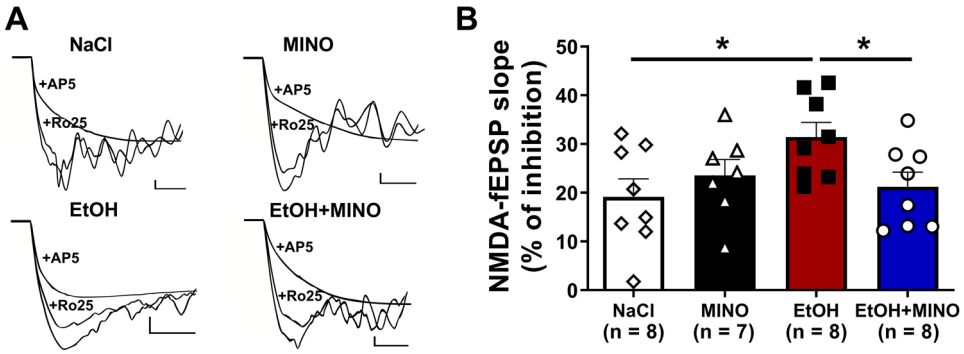


Fig. 6 NMDA-fEPSP response to Ro25-6981, a GluN2B antagonist. A) Averaged raw signal during baseline, after 5 µM Ro25-6981 (Ro-25) and in the presence of 50 µM D-AP5 for each group (vertical calibration bar: 0.02 mV; horizontal calibration bar: 10 ms). **B)** Bar graph illustrating the percentage of fEPSPs slope inhibition. Minocycline (MINO) alone had no effect. After EtOH, the inhibition was increased, and a prior administration of MINO prevented this effect. Mean values are given ± standard error of the mean (SEM). n means numbers of slices. *$P < 0.05$. The number of animal for each group is: NaCl, N = 7; MINO, N = 4; EtOH N = 6; EtOH + MINO N = 5

animals. In the presence of BSA (n = 8, N = 4), LTD reached -35.8 ± 6.1% (Fig. 7A). When IL-1β was bath applied (n = 6, N = 4), LTD was abolished to—4.25 ± 9.1% (Student's t test, $P = 0.011$ compared to BSA alone; Fig. 7A-B). In additional experiments, we checked whether the blocking effect of IL-1β on LTD was permanent or transient. Here, we first blocked LTD with IL-1β, washed out the drug and tested again LTD. The result shows that IL-1β blocked LTD only when present in the bath and not on the long-term, after washout of the drug (Fig. 7C). These experiments demonstrate that IL-1β, a pro-inflammatory cytokine, disturbs synaptic LTD.

mRNA levels for neuroinflammatory markers are unaltered following the two alcohol exposure

Considering that IL-1β abolishes LTD when bath applied on slices, we documented other molecular actors related to neuroinflammation that may also modulate synaptic plasticity. We thus quantified the mRNA levels for neuroinflammatory markers such as TNF-α, IL-1β, IFN-γ and TGF-β. Interestingly, 48 h after ethanol, none of the mRNA levels were altered (Fig. 8), and neither minocycline nor indomethacin pretreatment had an effect (one-way ANOVA, $F_{3,28} = 0.899$, $P = 0.454$; $F_{3,28} = 0.062$, $P = 0.979$; $H_{3,28} = 2.122$, $P = 0.547$; $H_{3,28} = 0.071$, $P = 0.995$, respectively).

Cellular markers for neuroinflammation

Our results suggest that ethanol triggers neuroinflammation to abolish LTD 48 h later, but without any changes in the mRNA levels of inflammatory cytokines. These results suggest that microglial cells, which release cytokines, were possibly not activated at this time point. Using immunohistochemistry, we studied Iba1 labeling of morphological changes in microglia and the expression of TLR4 in NeuN-positive neurons 48 h after ethanol treatment in CA1 area to see whether LTD abolition was accompanied with microglia activation or not.

No microglial activation 48 h after ethanol exposure

A two-way ANOVA of cell body circularity showed no significant effect of both minocycline ($F_{1,30} = 3.161$, $P = 0.086$) and ethanol ($F_{1,30} = 0.007$, $P = 0.934$) and no significant

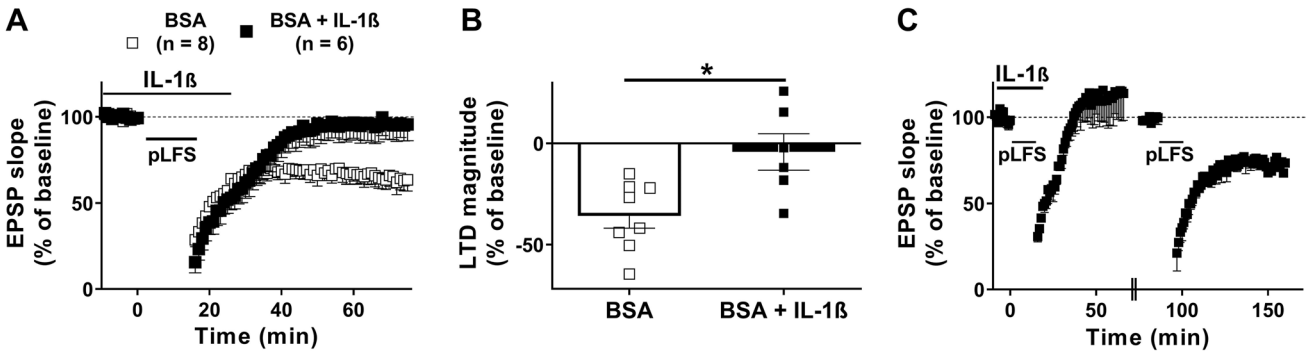


Fig. 7 IL-1β abolished LTD. (A) Bath application of BSA alone (N = 4, n = 8) had no effect on LTD magnitude, whereas Il-1β (in BSA) at 30 ng/ml abolished LTD (N = 4, n = 6)**. (B)** Bar graph summarizing the effects in A. **(C)** In independent experiments, we check that IL-1β was responsible for LTD blockade by inducing LTD after washout of the drug

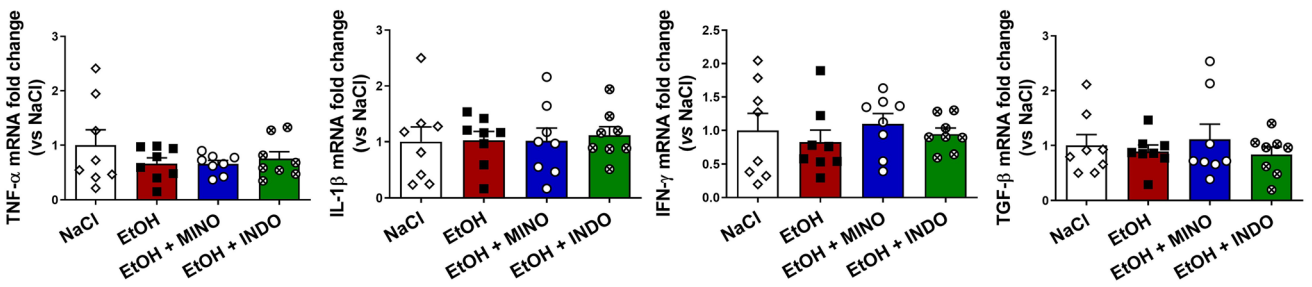


Fig. 8 mRNA expression for inflammatory markers 48 h after ethanol and effects of anti-inflammatory agents. mRNA levels for TNF-α, IL-1β, IFN-γ and TGF-β were not changed after ethanol, and there was no effect of the two anti-inflammatories tested

interaction ($F_{1,28}=0.651$, $P=0.426$, Fig. 9A-C). Regarding the cell body size, a two-way ANOVA showed no effect of both minocycline ($F_{1,30}=0.166$, $P=0.687$) and ethanol ($F_{1,30}=0.648$, $P=0.428$) and no significant interaction ($F_{1,28}=0.594$, $P=0.447$, Fig. 9B-C). Thus, neither ethanol exposure nor minocycline had an effect on the circularity and cell body size of microglia in the CA1 area at a 48-h delay.

TLR4 expression in the CA1 pyramidal cell layer 48 h after ethanol

TLR4 receptors were localized in the membrane of the CA1 pyramidal neurons labeled with NeuN (Fig. 10). A two-way ANOVA of TLR4 immunofluorescence showed no significant effect of both minocycline ($F_{1,25}=1063$, $P=0.314$) and ethanol ($F_{1,25}=1.211$, $P=0.283$) and a significant interaction between minocycline and ethanol ($F_{1,22}=5.209$, $P=0.033$). Post hoc analysis (Tukey's test) revealed that ethanol decreased TLR4 immunofluorescence in CA1 pyramidal neurons by 66% compared to control ($P=0.031$, Fig. 10A-C) and that minocycline pretreatment prevented this effect (EtOH *vs* MINO + EtOH, $P=0.029$, Fig. 8A-C). To normalize the labeling, we calculated the ratio between TLR4 and NeuN intensity (Fig. 10B). A two-way ANOVA showed an effect of minocycline ($F_{1,25}=9.4$,

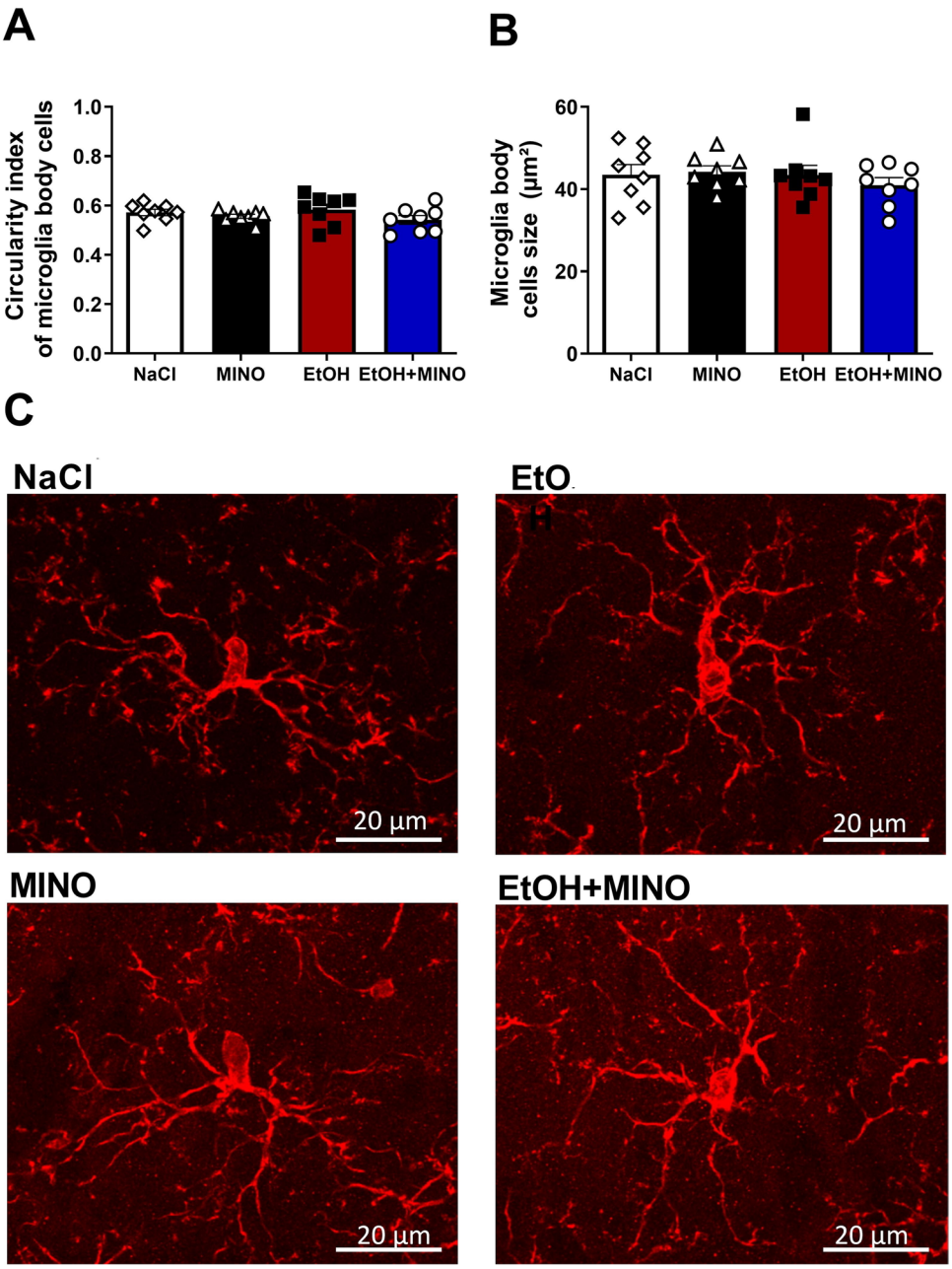


Fig. 9 Effects of minocycline on Iba1 immunofluorescence labeling in CA1 area 48 h after the two ethanol binge episodes. (A) Histogram of circularity index of microglia body cells. **(B)** Histogram of microglia body cells size. There was no effect of ethanol (EtOH) or minocycline (MINO) or the combination on these parameters. **(C)** Photographs of iba1 immunolabeling in the four groups tested

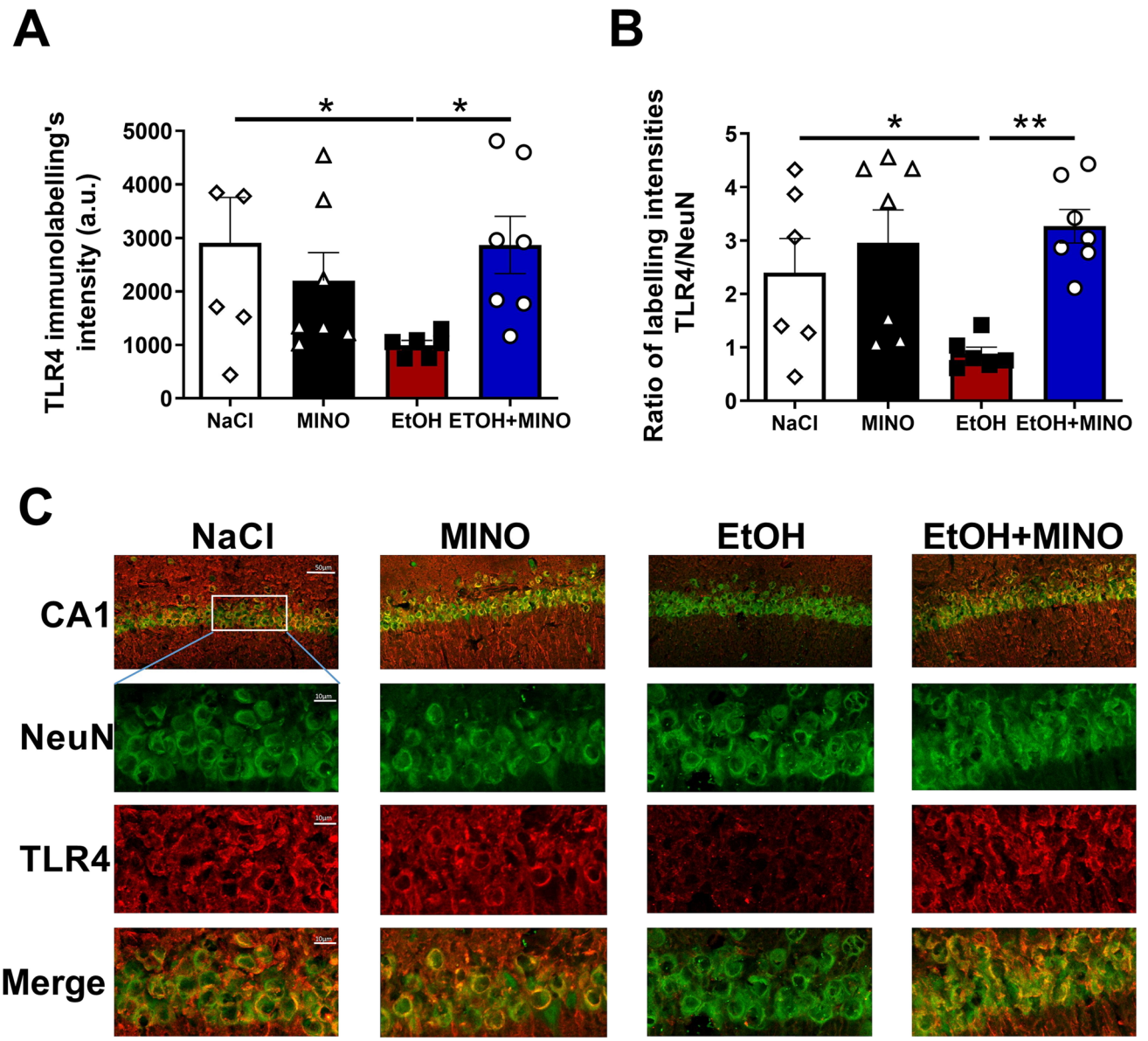


Fig. 10 TLR4 immunolabeling in NeuN labeled neurons in hippocampus CA1 area of adolescent rats 48 h after ethanol with or without minocycline. (A) Ethanol decreased the intensity of TLR4 labeling by 64% ($P=0.031$), and minocycline pretreatment prevented this effect (EtOH versus EtOH + MINO, $P=0.029$). **(B)** Ethanol decreased the ratio of TLR4 and NeuN labeling by -62% ($P=0.043$). Minocycline pretreatment prevented this effect (EtOH versus EtOH + MINO, $P=0.002$). **(C)** Photographs of NeuN, TLR4 and of the co-labeling showed at two different magnifications (scale bar at the top is 50 µm and is 10 µm at the bottom). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

$P=0.006$), no effect of ethanol ($F_{1,25}=1.57$, $P=0.223$) and no interaction ($F_{1,22}=3.604$, $P=0.071$). Post hoc analysis (Tukey's test) showed that ethanol decreased TLR4/NeuN ratio in CA1 by 65% compared to control ($P=0.043$) and that minocycline pretreatment prevented this effect (EtOH *vs* MINO + EtOH, $P=0.002$). Altogether, the results show that 48 h after two alcohol exposure, TLR4 is modulated only in pyramidal neurons.

Discussion

This study demonstrates that in adolescent rats, two ethanol binge-like exposures induce cognitive deficits at 48-h delay together with an increased role for GluN2B, a selective blockade of synaptic LTD and an increase in LTP in the hippocampus but without signs of neuroinflammation at cellular level and at the level of cytokines mRNA. However, the effects of ethanol at behavioral and cellular levels were

prevented by pretreatment with different anti-inflammatory agents, suggesting that ethanol exposure induced a rapid, short-lasting neuroinflammation that leads to the changes observed after 48 h.

Disturbances of bidirectional plasticity after only two binge-like episodes

Synaptic plasticity in the hippocampus is considered the mechanism underlying learning and memory. Indeed, LTD is necessary for novelty acquisition (Ge et al. 2010), consolidation of fear memory (Liu et al. 2014) and for working and episodic memories (Zeng et al. 2001). Here, LTD was decreased 48 h after only two ethanol-binge like exposures and this was accompanied with cognitive deficits in a learning task related to LTD (Ge et al. 2010). The present work confirms our previous studies (Silvestre de Ferron et al. 2015; Drissi et al. 2020) and extends them by showing that LTD is reduced at both the soma and the dendritic tree. These latter observations also extend the results from Roberto et al. (2002) who recorded dendritic and somatic LTP after chronic intermittent ethanol exposure along late adolescence in rats. However, it is acknowledged that changes in population spike are unlikely to reflect changes in synaptic strength related to memory. Nonetheless, any facilitation or reduction of synaptic transmission taking place in an ensemble of neurons during learning can be measured through monitoring the population spike magnitude. Indeed, learning is accompanied by parallel changes at both somatic and synaptic level in the hippocampus (Moser 1995). Moreover, GABA receptors are one of the many targets of ethanol and perisomatic inhibitory synapses alterations may be the origin of pathophysiological conditions (Wittner and Maglóczky 2017). Furthermore, both synaptic and somatic regulation of specific transmembrane currents (such as the *I*A potassium current) may be required to complete synaptic modification involved in memory (Yang et al. 2014). At last, it may happen that there is no concomitance of changes between population spike plasticity and fEPSPs, indicating predominant changes in cell excitability rather than modification in synaptic strength (Heginbotham and Dunwiddie 1991). Hence, the concomitance of LTD reduction at the two recording sites reveals that ethanol disturbs different cellular mechanisms at the same time and the difference related to the location of recordings probably reflects differences in the cellular mechanisms underlying somatic versus dendritic plasticity. Indeed, changes at somatic level may refer more to changes in excitability of the soma, while alteration of synaptic plasticity reflects changes in synaptic strength (Heginbotham and Dunwiddie 1991). Our results combined with those of Roberto et al. (2002) help to demonstrate that ethanol acts on both types of network properties at once: intrinsic excitability properties and synaptic strength. The present results are also consistent with those demonstrating an abolition of hippocampus LTD following two ethanol binge-like injections performed during neonatal period (Izumi et al. 2005) or in adult rats after chronic ethanol exposure (Thinschmidt et al. 2003). Surprisingly, the present decrease in LTD goes along with an increase of LTP 48 h after ethanol. This is the second time only that such result is reported after ethanol (Silvestre de Ferron et al. 2015). Interestingly, such phenotype of bidirectional plasticity has been also reported in an animal model of multiple sclerosis in which it was associated with neuroinflammation (Nisticò et al. 2013). In addition, we found that the sensitivity of NMDA-fEPSPs to Ro25-6981, a GluN2B antagonist, is increased 48 h after ethanol, an effect we correlated with an increased expression of the subunit (Drissi et al. 2020). We also confirm the shift of the BCM-like curve to the left after ethanol, indicating a greater ability for the network to trigger LTP, while LTD induction becomes more difficult. This is consistent with the idea that a low GluN2A-to-GluN2B ratio decreases the probability to induce LTD (Paoletti et al. 2013; Silvestre de Ferron et al. 2015). Importantly, minocycline pre-treatment restored the BCM-like curve to control, demonstrating that ethanol-induced neuroinflammation participates to the left shift of the curve and that ethanol exposure even as short as two binges induced metaplasticity, which, in turn, is responsible for cognitive deficits.

Neuroinflammation and the effects of two binges

Minocycline pretreatment prevented the two binge induced memory impairment, the alterations in hippocampus plasticity and the higher NMDA-fEPSPs sensitivity to a GluN2B antagonist as well as the BCM-like curve shift. Importantly, prior administration of indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory and of the TLR4 receptor antagonist TAK-242 also prevented the ethanol-induced abolition of LTD. Altogether, three structurally unrelated compounds with distinct pharmacological targets, all with anti-inflammatory properties, prevented the effects of ethanol. Thus, ethanol-induced inflammation and TLR4 activation are very likely to be responsible for cellular and behavioral effects of only two binges although we did not reveal the presence of an early inflammatory state that is during the intoxicating effects of ethanol. Nonetheless, these results have to be considered in the light of those showing that during ethanol intoxication, peripheral inflammation is present in humans 20 min

after a single binge drinking session with a blood ethanol level of about 130 mg/dl (Afshar et al. 2015). The herein reported results regarding minocycline are in accordance with those revealing the effectiveness of minocycline in preventing the effects related to ethanol-induced neuroinflammation after a longer exposure (Pascual et al. 2011; Qin and Crews, 2012), ethanol's rewarding properties (Gajbhiye et al. 2017) or ethanol intake (Agrawal et al. 2011). However, in our study microglial cells did not show morphological changes at the time of LTD blockade, suggesting an absence of microglial reactivity at this time point. TLR4 receptor is expressed on microglia, astrocytes and neurons (Tang et al. 2007; Okun et al. 2011; Li et al. 2015b), and we measured a decrease in CA1 pyramidal neurons TLR4 immunofluorescence that was interestingly, prevented by minocycline. Lack of microglial reactivity and decreased in TLR4 labeling are in contradiction with other studies. TLR4-related signaling pathways (MAPK, NF-ĸB), proinflammatory mediators (COX-2, i-NOS, HMGB1) and mnesic dysfunctions have been revealed at the end of a two-week intermittent ethanol exposure in adolescent mice, and these responses were TLR4-dependent (Montesinos et al. 2016). The discrepancies with these studies may come from higher doses of ethanol tested and a longer exposure inducing an increased TLR4 expression at 24 h that remains until adulthood (Qin and Crews 2012; Vetreno and Crews 2012). Because of the short exposure duration we used and the lower dose of ethanol tested, it is conceivable that ethanol-induced neuroinflammation occurred during the presence of ethanol in the body and did not last for 48 h. In this context, the lack of microglia reactivity 48 h later and the preventing effects of different anti-inflammatory are not surprising. Regarding neuronal TLR4 labeling, we found a decrease 48 h after ethanol which was absent after minocycline pretreatment. This result suggests that ethanol modulates TLR4 as suggested after a longer binge-like ethanol exposure during adolescence (Montesinos et al. 2018). In fact, there is a lack of data regarding the time course of microglia activity after ethanol exposure although a recent study brought new insight on this matter (Peng and Nixon 2021). In other models of induced neuroinflammation, like after mechanical brain damage in the hippocampus, an increased expression of neuronal TLR4 was detected after 4 h, with a peak at 24 h, a visible recovery after 3 days and total recovery at 7 days (Li et al. 2015a). Finally, we hypothesize that our measurements were taken at a time when the immune response was terminated, that is the peak of TLR4 expression occurred early after binge-like intoxication followed by a negative regulation. This hypothesis is supported by the mRNA levels of the different cytokines measured at 48 h. Although we were limited by the use of mRNA analysis only, we did not detect any increase of cytokines that could potentially blocked LTD as we found for IL-1β, suggesting that at 48 h the blockade of LTD is not due to a residual neuroinflammation accompanied with a high level of cytokines. Nonetheless, complementary experiments are necessary to define the kinetic of inflammation in this model of two binges.

Could we suggest a sequence of events after ethanol binge drinking?

Our results refute the hypothesis that the blockade of LTD 48 h after two binges is due to the presence of neuroinflammation with a high level of cytokine at that time point. Thus, it is necessary to find another way to explain the blockade of LTD after only few binge-like exposures. Another key effect of repeated ethanol exposure is the alteration of the epigenome as many studies demonstrated before (Legastelois et al. 2017; Pandey et al. 2017). Indeed, the inhibitory effects of only two binges on memory and LTD were prevented with an HDAC inhibitor (Drissi et al. 2020) and Pascual et al. (2011) showed that chronic ethanol exposure led to cognitive impairments associated with a decrease of histone acetylation in the hippocampus of mice, which were not present in mice lacking the TLR4 receptors. Thereby, a hypothesis is that early and short-lasting neuroinflammation induced by ethanol binge-like episodes triggers TLR4 receptor activation, which in turn leads to epigenetic changes, a blockage of synaptic LTD, inducing learning and memory deficits. However, the functional relationship between ethanol-induced epigenetic modifications and plasticity disturbances in our model needs to be further investigated to determine whether all effects of ethanol are related to the unique modulation of GluN2B subunit expression as we previously suggested (Drissi et al. 2020).

To conclude, there is a therapeutic potential of anti-inflammatory to prevent the long-term consequences of drug abuse in adolescence (Guerri and Pascual 2019), notably on ethanol intake (Agrawal et al. 2011), withdrawal-induced anxiety and relapse (Gajbhiye et al. 2018). In a similar vein, early TLR4 inhibition reduces hippocampal injury at puberty in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain damage (Tang et al. 2019), demonstrating a major role of TLR4 in the downstream neuroinflammatory events related to brain injury. Here, we showed that anti-inflammatory drugs administered at the same time that ethanol binge-like episodes prevent the effects of ethanol on learning and memory. Therefore, anti-inflammatory treatment appears to be good candidate for preventing most of the short- and long-term effects of alcohol on the brain during adolescence.

Acknowledgements CD and CM are PhD students supported by the Région Hauts-de-France, University of Picardy Jules Verne and the Ministry of French Research and Education. GF is supported by ERA-NET program: Psi-Alc (FKZ: 01EW1908)

Declarations

Conflict of interest "The authors declare no conflict of interest".

References

Afshar M, Richards S, Mann D et al (2015) Acute immunomodulatory effects of binge alcohol ingestion. Alcohol 49:57–64. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.10.002

Agrawal RG, Hewetson A, George CM et al (2011) Minocycline reduces ethanol drinking. Brain Behav Immun 25:S165–S169. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.002

Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R et al (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. Neuropharmacology 67:521–531. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.007

Beresford TP, Arciniegas DB, Alfers J et al (2006) Hippocampus Volume Loss Due to Chronic Heavy Drinking. Alcohol: Clin Exp Res 30:1866–1870. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00223.x

Bertani I, Iori V, Trusel M et al (2017) Inhibition of IL-1β Signaling Normalizes NMDA-Dependent Neurotransmission and Reduces Seizure Susceptibility in a Mouse Model of Creutzfeldt-Jakob Disease. J Neurosci 37:10278–10289. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1301-17.2017

Carbia C, Cadaveira F, Caamaño-Isorna F et al (2017) Binge drinking during adolescence and young adulthood is associated with deficits in verbal episodic memory. PLoS ONE 12:e0171393. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171393

Courtney KE, Polich J (2009) Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. Psychol Bull 135:142–156. https://doi.org/10.1037/a0014414

Crews FT, Qin L, Sheedy D et al (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. Biol Psychiatry 73:602–612. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.030

Drissi I, Deschamps C, Fouquet G et al (2020) Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. Addict Biol 25:e12760. https://doi.org/10.1111/adb.12760

Flood L, Korol SV, Ekselius L et al (2019) Interferon-γ potentiates GABAA receptor-mediated inhibitory currents in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neuroimmunol 337:577050. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577050

Gajbhiye SV, Tripathi RK, Salve B et al (2017) Evaluation of effect of minocycline on rewarding potential and alcohol relapse in place preference model in mice. Neurosci Lett 649:28–33. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.007

Gajbhiye SV, Tripathi RK, Petare A et al (2018) Minocycline in Alcohol Withdrawal Induced Anxiety and Alcohol Relapse in Rats. Curr Clin Pharmacol 13:65–72. https://doi.org/10.2174/1574884713666180228110310

Ge Y, Dong Z, Bagot RC et al (2010) Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. Proc Natl Acad Sci USA 107:16697–16702. https://doi.org/10.1073/pnas.1008200107

Gierski F, Stefaniak N, Benzerouk F et al (2020) Component process analysis of verbal memory in a sample of students with a binge drinking pattern. Addict Behav Rep 12:100323. https://doi.org/10.1016/j.abrep.2020.100323

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L et al (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8174–8179. https://doi.org/10.1073/pnas.0402680101

Guerri C, Pascual M (2019) Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development. Int J Dev Neurosci 77:89–98. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006

Haber M, James J, Kim J et al (2018) Minocycline plus N-acteylcysteine induces remyelination, synergistically protects oligodendrocytes and modifies neuroinflammation in a rat model of mild traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 38:1312–1326. https://doi.org/10.1177/0271678X17718106

Heginbotham LR, Dunwiddie TV (1991) Long-term increases in the evoked population spike in the CA1 region of rat hippocampus induced by beta-adrenergic receptor activation. J Neurosci 11:2519–2527

Hoshino K, Hasegawa K, Kamiya H, Morimoto Y (2017) Synapse-specific effects of IL-1β on long-term potentiation in the mouse hippocampus. Biomed Res 38:183–188. https://doi.org/10.2220/biomedres.38.183

Hwang J-W, Jeon Y-T, Lim Y-J, Park H-P (2017) Sevoflurane post-conditioning-induced anti-inflammation via inhibition of the toll-like receptor-4/nuclear factor kappa B pathway contributes to neuroprotection against transient global cerebral ischemia in rats. Int J Mol Sci 18. https://doi.org/10.3390/ijms18112347

Ikegaya Y, Delcroix I, Iwakura Y et al (2003) Interleukin-1beta abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. Synapse 47:54–57. https://doi.org/10.1002/syn.10154

Izumi Y, Kitabayashi R, Funatsu M et al (2005) A single day of ethanol exposure during development has persistent effects on bi-directional plasticity, N-methyl-D-aspartate receptor function and ethanol sensitivity. Neuroscience 136:269–279. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.015

Legastelois R, Jeanblanc J, Vilpoux C et al (2017) Epigenetic mechanisms and alcohol use disorders: a potential therapeutic target. Biol Aujourdhui 211:83–91. https://doi.org/10.1051/jbio/2017014

Li Y, Korgaonkar A, Swietek B et al (2015) Toll-like receptor 4 enhancement of non-NMDA synaptic currents increases dentate excitability after brain injury Ying. Neurobiol Dis 74:240–253. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371

Li Y, Korgaonkar AA, Swietek B et al (2015) Toll-like receptor 4 enhancement of non-NMDA synaptic currents increases dentate excitability after brain injury. Neurobiol Dis 74:240–253. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.021

Liu X, Gu Q-H, Duan K, Li Z (2014) NMDA receptor-dependent LTD is required for consolidation but not acquisition of fear memory. J Neurosci 34:8741–8748. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-13.2014

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25(4):402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lu Y, Giri PK, Lei S et al (2017) Pretreatment with minocycline restores neurogenesis in the subventricular zone and subgranular zone of the hippocampus after ketamine exposure in neonatal rats. Neuroscience 352:144–154. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.057

Maggio N, Vlachos A (2018) Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through

intracellular calcium stores. J Mol Med (berl) 96:1039–1047. https://doi.org/10.1007/s00109-018-1674-1
Maurage P, Lannoy S, Mange J et al (2020) What We Talk About When We Talk About Binge Drinking: Towards an Integrated Conceptualization and Evaluation. Alcohol Alcohol 55:468–479. https://doi.org/10.1093/alcalc/agaa041
Montesinos J, Pascual M, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Guerri C (2016) Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. Brain Behav Immun 53:159–171. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.006
Montesinos J, Pascual M, Millán-Esteban D, Guerri C (2018) Binge-like ethanol treatment in adolescence impairs autophagy and hinders synaptic maturation: Role of TLR4. Neurosci Lett 682:85–91. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.05.049
Moser EI (1995) Learning-related changes in hippocampal field potentials. Behav Brain Res 71:11–18. https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00051-8
Muñoz MD, Antolín-Vallespín M, Tapia-González S, Sánchez-Capelo A (2016) Smad3 deficiency inhibits dentate gyrus LTP by enhancing GABAA neurotransmission. J Neurochem 137:190–199. https://doi.org/10.1111/jnc.13558
Nagel BJ, Schweinsburg AD, Phan V, Tapert SF (2005) Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. Psychiatry Res 139:181–190. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2005.05.008
Nisticò R, Mango D, Mandolesi G et al (2013) Inflammation subverts hippocampal synaptic plasticity in experimental multiple sclerosis. PLoS ONE 8:e54666. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054666
Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. Trends Neurosci 34:269–281. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005
Oliveira AC, Pereira MC, da Santana LN, S, et al (2015) Chronic ethanol exposure during adolescence through early adulthood in female rats induces emotional and memory deficits associated with morphological and molecular alterations in hippocampus. J Psychopharmacol 29:712–724. https://doi.org/10.1177/0269881115581960
Pandey SC, Kyzar EJ, Zhang H (2017) Epigenetic Basis of the Dark Side of Alcohol Addiction. Neuropharmacology 122:74–84. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.02.002
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
Pascual M, Blanco AM, Cauli O et al (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. Eur J Neurosci 25:541–550. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x
Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S et al (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. Brain Behav Immun 25(Suppl 1):S80-91. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.012
Pascual M, Montesinos J, Guerri C (2018) Role of the innate immune system in the neuropathological consequences induced by adolescent binge drinking. J Neurosci Res 96:765–780. https://doi.org/10.1002/jnr.24203
Peng H, Nixon K (2021) Microglia Phenotypes Following the Induction of Alcohol Dependence in Adolescent Rats. Alcohol Clin Exp Res 45:105–116. https://doi.org/10.1111/acer.14504
Qin L, Crews FT (2012) Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. J Neuroinflammation 9:130. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-130
Rabiant K, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O (2021) Sex difference in the vulnerability to hippocampus plasticity impairment after binge-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key? Addict Biol 26:e13002. https://doi.org/10.1111/adb.13002
Risher M-L, Fleming RL, Risher C et al (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
Roberto M, Nelson TE, Ur CL, Gruol DL (2002) Long-term potentiation in the rat hippocampus is reversibly depressed by chronic intermittent ethanol exposure. J Neurophysiol 87:2385–2397. https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2385
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
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
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(1):pyv087. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv087
Smith KW, Gierski F, Andre J et al (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. https://doi.org/10.1111/adb.12332
Spear LP (2018) Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. Nat Rev Neurosci 19:197–214. https://doi.org/10.1038/nrn.2018.10
Swartzwelder HS, Hogan A, Risher M-L et al (2014) Effect of subchronic intermittent ethanol exposure on spatial learning and ethanol sensitivity in adolescent and adult rats. Alcohol 48:353–360. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.02.003
Tang S-C, Arumugam TV, Xu X et al (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc Natl Acad Sci U S A 104:13798–13803. https://doi.org/10.1073/pnas.0702553104
Tang Z, Cheng S, Sun Y et al (2019) Early TLR4 inhibition reduces hippocampal injury at puberty in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain damage via regulation of neuroimmunity and synaptic plasticity. Exp Neurol 321:113039. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113039
Tang X-H, Zhang G-F, Xu N et al (2020) Extrasynaptic CaMKIIα is involved in the antidepressant effects of ketamine by down-regulating GluN2B receptors in an LPS-induced depression model. J Neuroinflammation 17:181. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01843-z
Tavolacci M-P, Berthon Q, Cerasuolo D et al (2019) Does binge drinking between the age of 18 and 25 years predict alcohol dependence in adulthood? A retrospective case-control study in France. BMJ Open 9:e026375. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026375
Thinschmidt JS, Walker DW, King MA (2003) Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. Synapse 48:189–197. https://doi.org/10.1002/syn.10203
Vetreno RP, Crews FT (2012) Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. Neuroscience 226:475–488. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.046
Vetreno RP, Crews FT (2015) Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. Front Neurosci 9:35. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00035

Vetreno RP, Lawrimore CJ, Rowsey PJ, Crews FT (2018) Persistent Adult Neuroimmune Activation and Loss of Hippocampal Neurogenesis Following Adolescent Ethanol Exposure: Blockade by Exercise and the Anti-inflammatory Drug Indomethacin. Front Neurosci 12:200. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00200

Wang N, Mi X, Gao B et al (2015) Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuroscience 287:144–156. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.021

Wittner L, Maglóczky Z (2017) Synaptic Reorganization of the Perisomatic Inhibitory Network in Hippocampi of Temporal Lobe Epileptic Patients. Biomed Res Int 2017:7154295. https://doi.org/10.1155/2017/7154295

Yang Y-S, Kim K-D, Eun S-Y, Jung S-C (2014) Roles of somatic A-type K(+) channels in the synaptic plasticity of hippocampal neurons. Neurosci Bull 30:505–514. https://doi.org/10.1007/s12264-013-1399-7

Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M et al (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. Cell 107:617–629. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00585-2

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article 3

Astrogliosis and compensatory neurogenesis after the first ethanol binge drinking-like exposure in the adolescent rat

Vilpoux C, Fouquet G, Deschamps C, Lefebvre E, Gosset P, Antol J, Zabijak L, Marcq I, Naassila M, Pierrefiche O.

Dans les modèles précliniques d'exposition à l'éthanol et notamment au *binge drinking*, des altérations au niveau cérébral de l'intégrité structurale sont communément rapportées et concernent notamment la neurogénèse et les processus inflammatoires, suggérés comme participant aux atteintes cognitives à long terme. Dans cette étude, nous avons cherché à définir si ces effets cellulaires de l'éthanol étaient mis en jeu dans l'hippocampe dès les premières intoxications éthyliques et qui pourraient jouer un rôle dans les perturbations cognitives que nous observons dans notre modèle. Pour cela, nous avons mesuré la neurogénèse, la densité neuronale, l'activation microgliale et astrocytaire, la neuroinflammation et la synaptogénèse par les techniques d'immunohistochimie et de cytométrie en flux dans l'hippocampe 48h après deux épisodes de type *binge drinking*. Nos résultats révèlent une astrogliose dans le gyrus denté accompagnée d'une diminution de la densité de neurones matures et d'une augmentation du nombre de nouveaux neurones. Dans le gyrus denté et l'aire CA1, nous observons également une diminution de l'expression du TLR4 neuronal alors que celle-ci est inchangée au niveau microglial dans CA1. De plus, nous rapportons une diminution de la synaptophysine dans CA1, suggérant une perte de synapses.

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une souffrance tissulaire et la mise en place d'une neurogénèse dans l'hippocampe, 48h après les deux épisodes de type *binge drinking* à l'adolescence. L'absence d'activation microgliale et la diminution du TLR4 neuronal indiquent que les perturbations cognitives que nous rapportons à 48h ne sont pas dues à un état neuroinflammatoire persistant. De plus, la présence concomitante d'une neurogénèse et

d’une astrogliose dans le gyrus denté pourrait suggérer la mise en place de mécanismes de réparation.

Check for updates

Received: 7 May 2021 | Accepted: 29 November 2021

DOI: 10.1111/acer.14757

ALCOHOLISM CLINICAL & EXPERIMENTAL RESEARCH

ORIGINAL ARTICLE

Astrogliosis and compensatory neurogenesis after the first ethanol binge drinking-like exposure in the adolescent rat

Catherine Vilpoux[1] | Gregory Fouquet[1] | Chloe Deschamps[1] | Elise Lefebvre[1] | Philippe Gosset[1] | Johann Antol[1] | Luciane Zabijak[1,2] | Ingrid Marcq[1] | Mickael Naassila[1] | Olivier Pierrefiche[1]

[1]UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

[2]Plateforme d'Ingénierie Cellulaire & Analyses des Protéines (ICAP), Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

Correspondence
Catherine Vilpoux, UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Université de Picardie Jules Verne, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Chemin du Thil, 80025 Amiens, France.
Email: catherine.vilpoux@u-picardie.fr

Funding information
Conseil Regional des Hauts de France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Abstract

Background: Multiple ethanol binge drinking-like exposures during adolescence in the rat induce neuroinflammation, loss of neurogenesis, and cognitive deficits in adulthood. Interestingly, the first ethanol binge drinking-like exposure during adolescence also induces short- term impairments in cognition and synaptic plasticity in the hippocampus though the cellular mechanisms of these effects are unclear. Here, we sought to determine which of the cellular effects of ethanol might play a role in the disturbances in cognition and synaptic plasticity observed in the adolescent male rat after two binge-like ethanol exposures.

Methods: Using immunochemistry, we measured neurogenesis, neuronal loss, astrogliosis, neuroinflammation, and synaptogenesis in the hippocampus of adolescent rats 48 h after two binge-like ethanol exposures (3 g/kg, i.p., 9 h apart). We used flow cytometry to analyze activated microglia and identify the TLR4-expressing cell types.

Results: We detected increased hippocampal doublecortin immunoreactivity in the subgranular zone (SGZ) of the *dentate gyrus* (DG), astrogliosis in the SGZ, and a reduced number of mature neurons in the DG and in CA3, suggesting compensatory neurogenesis. Synaptic density decreased in the *stratum oriens* of CA1 revealing structural plasticity. There was no change in microglial TLR4 expression or in the number of activated microglia, suggesting a lack of neuroinflammatory processes, although neuronal TLR4 was decreased in CA1 and DG.

Conclusions: Our findings demonstrate that the cognitive deficits associated with hippocampal synaptic plasticity alterations that we previously characterized 48 h after the first binge-like ethanol exposures are associated with hippocampal structural plasticity, astrogliosis, and decreased neuronal TLR4 expression, but not with microglia reactivity.

KEYWORDS
adolescence, astrogliosis, binge drinking, hippocampus, neuroinflammation

 © 2021 by the Research Society on Alcoholism.

INTRODUCTION

Binge drinking is the consumption of a large amount of ethanol (EtOH) in a short period of time to reach drunkenness. Binge drinking behavior is thus characterized by a high speed of alcohol consumption, and refers to an episodic behavior, punctuated by abstinent periods between drinking episodes (Rolland & Naassila, 2017). Such pattern of EtOH consumption is highly prevalent in the adolescent/young adult. In France, half of the 17-year-olds reported drinking at least 50 g EtOH on one occasion in the past month in 2017 (Spilka et al., 2018) and 25% of men and 7% of women of 20 years had binge drinking episodes at least twice a month (Tavolacci et al., 2016). Importantly, frequent binge drinking behavior, notably when performed for several years during adolescence/young adult age, is now recognized as a risk factor for alcohol dependence in adulthood (Tavolacci et al., 2019). Accordingly, in men, high amounts of alcohol consumption at the age of 16 increases the odds of being a heavy drinker (Englund et al., 2008), while binge drinking during the college years is, for both genders, a significant risk factor for alcohol dependence later in life (Jennison, 2004; McCambridge et al., 2011). At cerebral level, such behavior led to structural and functional damages including degradations in neural white matter, impaired cognitive functions (García-Moreno et al., 2008; Smith et al., 2017), episodic memory deficits (Carbia et al., 2017), and impaired empathic responses to other's pain (Rae et al., 2020). Preclinical studies in rats have shown that alcohol exposure during adolescence disrupts normal brain development (Crews et al., 2016; Spear, 2018), reduces performance on working memory task (Vargas et al., 2014), and increases the risk of developing alcohol use disorder in adulthood (Alaux-Cantin et al., 2013; Amodeo et al., 2018). Such animal studies often tested a binge procedure of 4 to 16 days interspersed with days without EtOH, followed by a period of abstinence before the measurements were performed. In these conditions, long-lasting alterations in brain structural integrity, including loss of hippocampal neurogenesis has been measured and suggested to underlie the reduction in cognitive function observed in the adult (Crews & Vetreno, 2014; Crews et al., 2016; He et al., 2005). In addition, EtOH-induced neuroinflammation has been associated with long-lasting neurobehavioral deficits in the adult (Guerri & Pascual, 2019) through the activation of the microglia which produces inflammatory mediators via activation of the Toll-like receptor 4 (TLR4; Fernandez-Lizarbe et al., 2009), a member of the interleukin-1 receptor/toll-like receptor (TLR) superfamily. Chronic or subchronic alcohol consumption is thus accompanied with increased production and release of proinflammatory cytokines, and TLR4 knockout mice are protected from EtOH-induced glial cell activation (Pascual et al., 2015, 2018). Furthermore, both astrogliosis and neuroinflammation (Escartin et al., 2019; Stogsdill & Eroglu, 2017) have been reported after multiple EtOH binge drinking-like exposures. Thus, the large majority of studies investigated the effects of repeated (often during several days and weeks) binge drinking-like exposures during adolescence.

However, even a single day of EtOH exposure in adult rats can induce a transient reactive astrogliosis in the hippocampus measured after 48 h (Hayes et al., 2013). In a similar vein, we showed that two binge drinking-like exposures in 1 day in adolescent male rats induced cognitive deficits 48 h later, associated with the abolition of long-term synaptic depression (LTD) in hippocampus slices that lasted for 3 days but were no longer present 4 to 8 days after binges (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015).

Because the very first binge drinking episodes have deleterious effects on memory and its cellular mechanisms in hippocampus a few days later, we wanted to know if they were associated with neuroinflammatory processes, astrogliosis, and compensatory mechanisms such as neurogenesis and synaptogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Thirty-three male Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories) arrived in the animal care unit at 4-week-old; they were housed two rats in one cage and kept under standard conditions with free access to food and water. Rats were sacrificed at 42-days-old. All experiments were carried out 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 local ethics committee rules (CREMEAP, University of Picardie Jules Verne).

Treatment and animal groups

One group of rats received two intraperitoneal (i.p.) injections of EtOH (VWR) at a dose of 3 g/kg, 9 h apart, at 8:00 a.m. and 5:00 p.m., using a 20% (w/v) diluted EtOH solution (ALC group) as previously described (Silvestre de Ferron et al., 2015). The BEC reached 197 ± 19 mg/dl 30 min after the first injection and was back to 0 after 9 h (7.9 ± 1 mg/dl), just before the second injection. The control group (CTL) comprised rats receiving isovolumetric i.p. injections of 0.9% saline solution following the same schedule as for EtOH. All rats received the injections when 40-days-old and were sacrificed 48 h after the first injection. For immunohistochemistry, $n = 7$ to 9 ALC and $n = 7$ to 10 CTL rats were tested. For flow cytometry experiment, $n = 7$ CTL and $n = 7$ ALC rats were tested.

Immunolabeling experiment

Preparation of brain slices

Rats were deeply anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and received heparin (2500 UI, i.p.) to avoid clots formation. Rats were transcardially perfused with heparinized 0.9% saline followed by iced 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Brains were postfixed in PFA and transferred

to 30% sucrose. Coronal sections (50 μm) were cut along the hippocampus (Bregma −2.30 to −3.30 mm) using a cryostat and stored at −20°C in a cryoprotective solution (Ethylene glycol 30%, Sucrose 30%, NaCl 0.9%, in PBS 1×).

Immunofluorescent labeling of doublecortin (DCX)

Floating sections were rinsed in Triton-PBS 1× in 12-well cell culture plates, incubated for 1 h at room temperature (RT) in blocking serum, then incubated for one night at 4°C with a Doublecortin mouse monoclonal antibody (E-5 clone) (diluted 1/750; Santa Cruz Biotechnology 390645). Slides were rinsed 3 × 5 min in Triton-PBS 1× and incubated for 1 h at room temperature in the dark in Triton-PBS 1× with a fluorochrome-coupled secondary antibody (donkey anti-mouse Alexa fluor 488 Jackson ImmunoResearch 715-545-150) diluted 1/250. Following washes, sections were mounted on gelatinized microscope slides (Life Technologies Prolong Gold P36931). The specificity of the two antibodies used was tested by omitting the primary antibody from an additional well of free floating samples. In such conditions, no immunoreactive cell was detected. For each rat, we analyzed the immunolabeling intensity in the region of interest; the subgranular zone (SGZ) in the dentate gyrus (DG).

Image analysis

For all immunofluorescent labeling, photographs were taken with an AxioCam camera using confocal microscopy (Zeiss LSM170). A *z*-stack of adjacent layers with the highest fluorescence intensity was recorded for each field, and pooled. For DCX labeling image analysis, the *z*-stack was done with ten 2 μm adjacent layers. Equally sized images were recorded from each tissue section with identical settings for excitation and detection, objective lens, aperture, laser power, and photomultiplier gain/offset. Investigators who were "blind" to the experimental conditions performed image's acquisition and quantification of labeling. All images were analyzed using ImageJ software (Version 1.50i; National Institute of Health; Schindelin et al., 2012), and in all cases, for each rat, the mean fluorescence, expressed as arbitrary units, was given as the mean between the left and right side of one brain slice.

Immunofluorescent colabeling of vimentin and GFAP

Floating sections were washed for 3× 5 min with Triton-PBS 1× (PB 0.1 M, 0.9% NaCl, 0.2% Triton x100, pH 7.5) for permeabilization, then bathed for 1 h at RT in blocking serum (PBS 1×, BSA 0.1%, TritonX100 0.2%, Goat serum 2% (Biowest)). Next, the sections were incubated for 48 h at 4°C with both mouse antivimentine (1/1000; MAB 3400, Merck-Millipore) and rabbit anti-GFAP (undiluted, 22522, Immunostar). Afterwards, sections were incubated for 1 h at RT in the dark in Triton-PBS 1× with both fluorochrome-coupled secondary antibodies (donkey anti-mouse Alexa fluor 488 Jackson ImmunoResearch (715-545-150)) and goat anti-rabbit Alexa fluor 594 (Abcam (ab 150080)). After four washes of 5 min with PBS 1× (0.9% NaCl, PB 0.1 M), sections were mounted in gelatinized microscope slides with Vectashield® HardSet™ Mounting Medium and covered with glass coverslips.

Image analysis

The z-stack was made of seven 2.42 μm adjacent layers. The region of interest, the SGZ, was drawn and placed over the same region for vimentin and GFAP labeling. Colocalization can be estimated by calculating a number of values representing the proportion of colocalized pixels and these values are called colocalization coefficients. We used the Pearson's correlation coefficient that describes the correlation of the intensity distribution between channels. Ranges from −1.0 to 1.0; 0 indicate no significant correlation and −1.0 indicates complete negative correlation (Zinchuk & Grossenbacher-Zinchuk, 2009).

Immunofluorescent colabeling of TLR4 and NeuN

Brain floating sections were washed three times for 5 min with PBS 1×-T (PB 0.1 M 0.9%, 0.2% Triton ×100, pH 7.5), treated 30 min in methanol with 3% H_2O_2, washed two times for 10 min in PBS 1×-T, and placed in goat blocking serum (PBS 0.1 M; 0.1% BSA; 0.2% Triton X-100; 2% Goat serum, Bio West, Cat no S2000-100) for 30 min at RT. Then, sections were incubated at 4°C for 48 h with primary antibodies rabbit anti-TLR4 (NB56566 Novus bio) and mouse anti-NeuN (MAB 377 Merck Millipore), respectively, diluted 1:50 and 1:100 in goat blocking serum. Afterwards, sections were washed three times for 5 min with PBS 1×-T and were incubated for 1 h at RT in a solution composed of Alexa 594 goat anti-rabbit IgG secondary antibody (111-585-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG secondary antibody (115-545-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories), both diluted 1:250 in a solution of blocking serum of goat (Bio West, Cat no. S2000-100) and horse (Vectastain ABC Kit (Universal) PK-6200). Following four washes of 5 min with PBS 1×, sections were mounted on gelatinized microscope slides and lamellae with DAPI (4′,6′-diamidino-2-phenylindole) containing mounting solution (Life Technologies Prolong Gold P36931). The specificity of the two antibodies used was tested by omitting the primary antibody from an additional well of free floating samples. In such conditions, no immunoreactive cells were detected.

Image analysis

We measured the colocalization of TLR4 and NeuN labeling in CA1 *stratum pyramidale* and granular zone (GZ) of DG. The *z*-stack was done with seven 2 μm adjacent layers. For each of the control rats and the EtOH-exposed rats, we chose randomly 10 neurons in the left and right side, in the two regions of interest, and then for each neuron, we measured the intensity of the immunofluorescence for NeuN and TLR4, and calculated the ratio of both labeling. NeuNwas localized in the nuclei of the neurons while TLR4 was on the membrane of the neurons. NeuN immunofluorescence was used as a

normalization labeling (as immunofluorescence level of each labeled neuron showed no changes between CTL and ALC), and the ratio of both labelings represents TLR4 changes. As a separate image analysis, we counted NeuN-positive cells in CA1, CA3, SGZ, and DG.

Immunofluorescent labeling of Iba1

Brain floating sections were washed three times for 5 min with PBS 1×-T (PB 0.1 M 0.9%, 0.2% Triton ×100, pH 7.5), then placed for 1 h at RT in donkey blocking serum (PBS 0.1 M; 0.1% BSA; 0.1% Triton X-100; 5% donkey serum). Sections were incubated at 4°C for 72 h with primary antibody goat anti-Iba1 diluted 1/200 ((ab5076, Abcam). Afterwards, sections were washed three times for 5 min with PBS 1×-0.1% Triton and were incubated for 1 h at RT in Alexa 594 donkey anti-goat secondary antibody (Interchim 705.585.147, Interbiotech) diluted 1/250. Following four washes of 5 min with PBS 1×, sections were mounted as described previously.

Image analysis

The *z*-stack was done with ten 2 μm adjacent layers. For each rat, we analyzed the body cells Iba1 immunolabeling intensity and the circularity index of 10 microglia cells taken randomly within CA1 *stratum pyramidale*.

Immunohistochemical labeling of synaptophysin

Synaptophysin immunoreactivity was revealed using a conventional avidin-biotin-immunoperoxidase technique. Floating sections were washed for 4× 10 min with Triton-PBS 1× (PB 0.1 M, 0.9% NaCl, 0.1% sodium azide, 0.2% Triton X100, pH 7.5) at RT for permeabilization, then incubated for 15 min with 3% H_2O_2 in methanol to quench endogenous peroxidases. Brain sections were then subjected to the antigen retrieval by citrate buffer to uncover epitopes. The floating slices were cooked in a microwave oven for 6× 1 min in citrate buffer (sodium citrate 10 mM, Tween 20 at 0.05%, pH 6). Between each microwave oven step, the slices were cooled on ice for 1 min. After rinsing 3 × 5 min in PBS, the sections were incubated for 1 h at RT with blocking solution containing 2% goat serum (PBS 1×, BSA 0.1%, TritonX100 0.2%, Goat serum 2% (Biowest)). The sections were then incubated for 12 h at 4°C with a rabbit antisynaptophysin antibody (Rabbit Anti-SYN Monoclonal Antibody clone YE269-04-1019 Millipore, diluted 1:500 in the 2% goat serum). Slides were rinsed in PBST and processed by using the Vectastain ABC Elite kit (Kit Vectastatain ABC Elite kit Universal PK-6200; Vector Laboratories) and then stained with diaminobenzidine and H_2O_2. Negative control was provided by omitting the primary antibody in antibody dilution buffer. In such conditions, no immunoreactive cell was detected. Immunolabeling was visualized using a light microscope connected to a computerized image analysis system Mercator® (Explora Nova). All images were acquired using the same light level by using a 10× objective lens, and analyzed by a "blind" experimenter. A basal threshold was established and then applied to the images. Subsequently, the grayscale digital image was classified into positive staining areas and background. We recorded the cells with an immunoreactivity above this threshold as immunopositive cells, as classically carried out in other studies (Wang et al., 2010). Immunopositive cells were counted, then normalized in areas of 100 000 μm^2, and these counts were averaged to produce a mean optical density per animal in each of the brain regions recorded.

Flow cytometry experiment

Methods for flow cytometry were previously described (Drissi et al., 2020). We dissociated isolated CA1 brain tissue into single-cell suspensions. The extracellular matrix was enzymatically digested using the Adult Brain Dissociation kit (Miltenyi Biotec), while gentle MACS™ Dissociator with Heaters was used for mechanical dissociation during the on-instrument enzyme incubation. Single-cell suspension was labeled with FITC-conjugated Ab specific for NeuN (ab190195, Abcam), PE-conjugated Ab for CD68 (Clone REA835, miltenyibiotec), PE-Vio770 conjugated Ab for CD11b (Clone REA325, miltenyibiotec), and TLR4 (ab22048, Abcam) to flow cytometry analysis. For FACS analysis, cells were incubated with antibodies in staining buffer (PBS and 2.5% FCS) for 30 min and washed. Labeled cells were analyzed on a MACSQuant cytometer running MACSQuantify software (Miltenyi Biotec) and FlowJo software (Tree Star). Flow cytometry analysis of TLR4 expression was performed in neurons, identified according to positive labeling for NeuN and negative labeling for CD11b. We performed flow cytometry analysis of TLR4 expression in microglia identified according to positive labeling for CD11b. Flow cytometry analysis of activated microglia was performed using positively labeled cells for CD68.

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed with unpaired Student's *t*-test on CTL versus ALC group unless indicated otherwise, using the SigmaPlot software (version 11; Systat software, Inc.). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Neurogenesis, number of neurons, and synaptic activity

We analyzed DCX labeling as a marker of new generated neurons (Gao et al., 2018). DCX labeling intensity in the SGZ was increased by 41% 48 h after the two binges (14.7 ± 1.2 a.u. in CTL vs. 20.7 ± 1.3 a.u. in ALC; $p = 0.002$; Figure 1A). There was a decrease in the number of NeuN-positive cells, indicating a lower number of

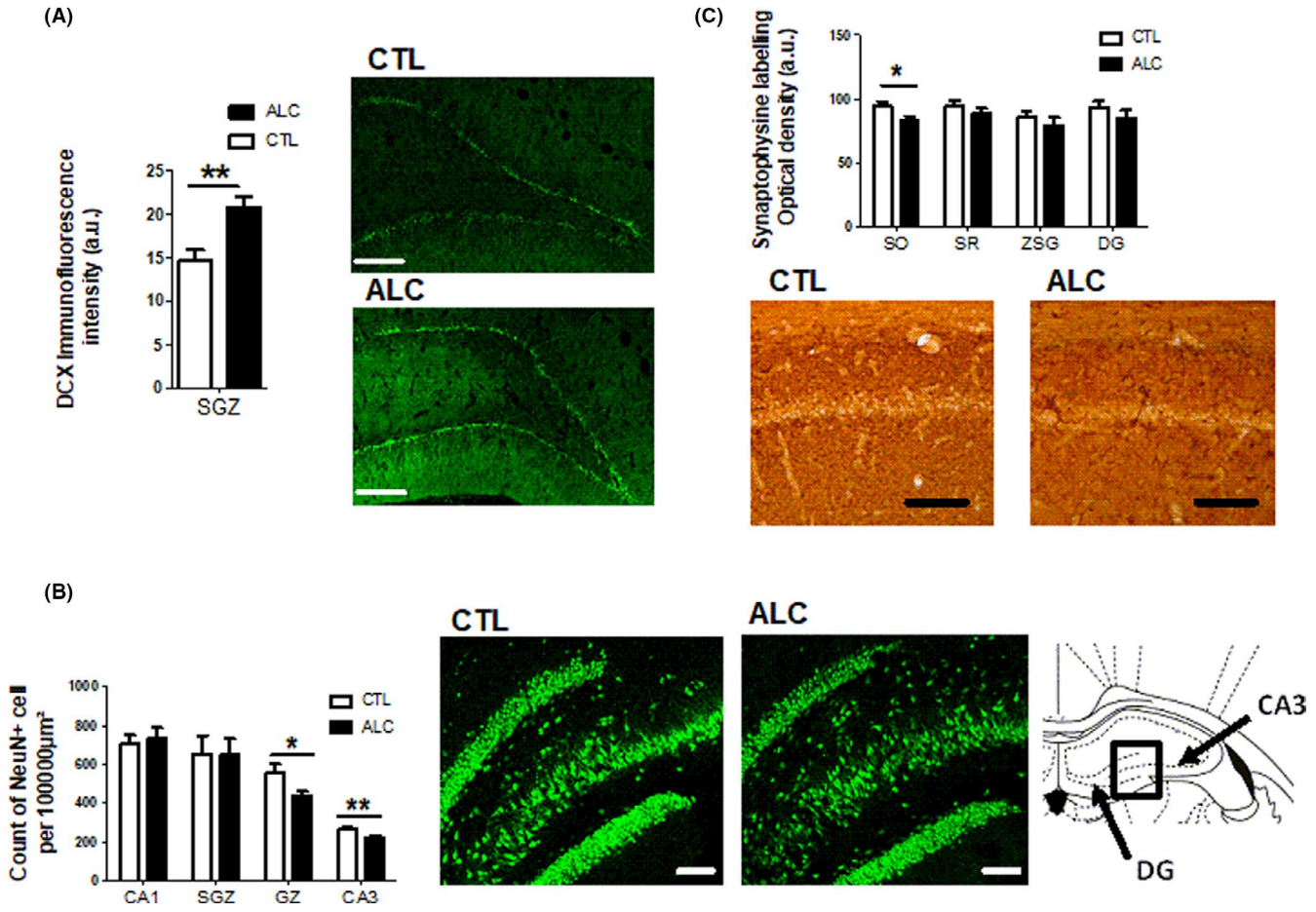


FIGURE 1 Neurogenesis, number of neurons, and synaptogenesis 48 h after the binges. (A) Left: DCX labeling in SGZ in control (CTL) ($n = 9$ rats) and 48 h after the binges (ALC; $n = 8$; one section per brain) showing an increase in DCX immunohistofluorescence (+41%, $p = 0.002$). Right: Microphotographs illustrating DCX labeling in CTL and ALC. Scale bar =200 μm. (B) Left: NeuN immunolabeling in CA1 and CA3 *stratum pyramidale*, SGZ, and upper part of granular zone (GZ) in CTL ($n = 9$) and ALC ($n = 7$) (one section per brain) showed a decrease in upper granular zone (GZ) (−22%, $p = 0.025$) and in CA3 (−16%; $p = 0.004$). Right: Microphotographs of NeuN labeling in DG and CA3 in CTL and ALC. Scale bar = 100 μm. The hippocampus drawing was published in The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition, Paxinos G. and Watson C., figure 35, copyright Academic Press, 1998. Black highlighted insert shows region of the picture. (C) Synaptophysin labeling in *stratum radiatum* (SR), *stratum oriens* (SO) of CA1, in the SGZ, and in the hilus of DG in CTL ($n = 8$) and ALC ($n = 7$; one section per brain, data are mean of right and left hemisphere). Top: A significant decrease in the labeling was measured in the SO (−12%, $p < 0.05$). Bottom: Microphotographs of synaptophysin labeling in CA1 in CTL and ALC. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$. Scale bar = 100 μm. a.u.: arbitrary unit

mature neurons, in the upper side of GZ by 22% (557 ± 44 neurons/100,000 μm^2 in CTL vs. 436 ± 24 neurons/100,000 μm^2 in ALC; $p = 0.025$) and in CA3 by 16% (266 ± 9 neurons/100,000 μm^2 in CTL vs. 223.86 ± 7 neurons/100,000 μm^2 in ALC; $p = 0.004$; Figure 1B). In contrast, there was no significant change in NeuN labeling in the SGZ of the DG (652 ± 92 neurons/100,000 μm^2 in CTL vs. 648 ± 82 neurons/100,000 μm^2 in ALC) and in the *stratum pyramidale* of CA1 (705 ± 44 neurons/100,000 μm^2 in CTL vs. 735 ± 54 neurons/100,000 μm^2 in ALC). Synaptophysin labeling (Figure 1C) appeared as a "foggy" labeling across *strata* of hippocampus as previously observed (Mitani et al., 2012). It was significantly decreased in the *stratum oriens* (SO) of CA1 area (94.2 ± 3.4 in CTL vs. 82.9 ± 3.6 a.u. in ALC; −12%, $p = 0.02$). No change in synaptophysin labeling was observed in the *stratum radiatum* (SR) of CA1 (94.3 ± 4.4 in CTL vs. 88.3 ± 4.3 in ALC), SGZ (85.4 ± 5.0 in CTL vs. 78.5 ± 6.9 in ALC), or in the hilus of the DG (93.6 ± 4.5 in CTL vs. 85.2 ± 6.0 in ALC). These experiments revealed structural plasticity (neurogenesis and synaptic density) and a loss of mature neurons in discrete areas of the hippocampus.

Vimentin, GFAP, and their colabeling

We analyzed vimentin and GFAP labelings and their colocalization to detect astrogliosis. In the SGZ of the DG (Figure 2A,B), vimentin immunofluorescence intensity increased by 34% in EtOH-exposed rats (10.45 ± 0.69 in CTL vs.14.03 ± 1.88 in ALC, $p = 0.04$) while there was no change in GFAP labeling, the marker for astrocytes (28.75 ± 4.43 a.u. in CTL vs. 30.59 ± 4.56 a.u. in ALC). The Pearson's coefficient for vimentin and GFAP colocalization was also increased (+23%, $p = 0.027$) due to an increase in vimentin expression, suggesting the presence of astrogliosis in the SGZ.

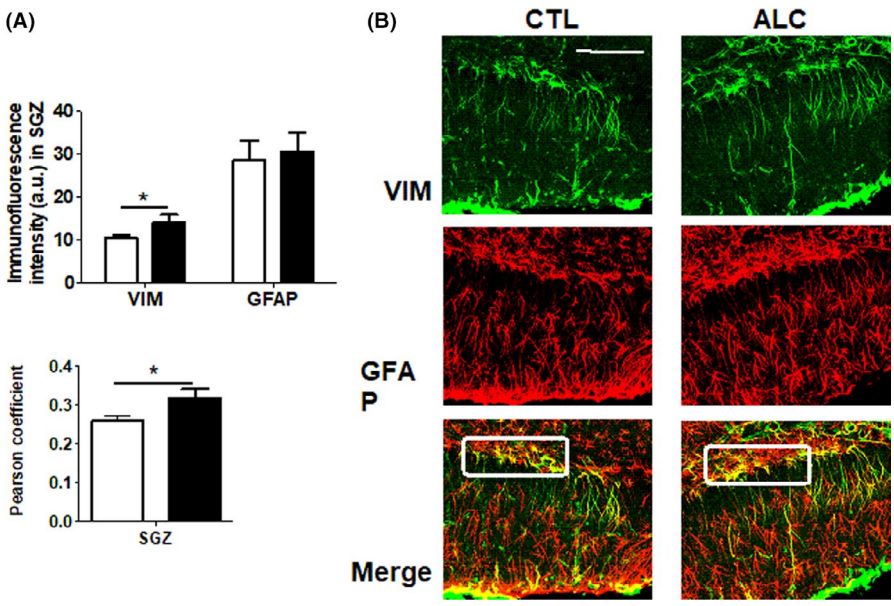


FIGURE 2 Vimentin and GFAP labeling in the SGZ. (A) Immunofluorescence intensity for vimentin and GFAP in SGZ (top) and Pearson's correlation coefficient (bottom) for CTL ($n = 9$) and 48 h after the two binges (ALC) ($n = 9$) (one section per brain, data are mean of right and left hemisphere). Vimentin intensity increased (+ 34%, $p = 0.04$) and Pearson coefficient increased (+ 23%, $p = 0.027$). (B) Microphotographs in DG: SGZ is in the white highlighted insert. Vimentin labeling (green), GFAP (red), and colocalization (orange) in CTL and ALC. (*$p < 0.05$). Scale =100 μm. a.u.: arbitrary unit

Microglial reactivity

There were no changes in the circularity index of body cell (0.58 ± 0.009 in CTL vs. 0.60 ± 0.02 in ALC; Figure 3A,B) or in Iba1 immunofluorescence intensity of microglia body cell (3069 ± 420 a.u. in CTL vs. 3144 ± 537 a.u. in ALC). We then measured with flow cytometry the proportion of microglia, identified by the expression of CD11b$^+$, among all cells extracted from the isolated CA1, and we measured the proportion of activated microglia (expressing CD11+b and CD68$^+$) among microglia cells (Figure 3C,D). The two EtOH binge-like exposures neither altered the proportion of microglia among all cells in CA1 (19.81 ± 2.81% for CTL vs. 16.79 ± 2.36 for ALC) or the mean fluorescent intensity (MFI) for microglia (1.93 ± 0.39 for CTL vs. 1.61 ± 0.28 for ALC; Figure 3C). The two EtOH binge-like exposures neither altered the proportion of activated microglia among microglia cells (9.98 ± 1.25% for CTL vs. 9.77 ± 1.59% for ALC) nor the MFI for activated microglia (1.93 ± 0.39 for CTL vs. 1.61 ± 0.28 for ALC, Figure 3D). Thus, there was no microglial reactivity 48 h after the two EtOH binge-like exposure.

TLR4 expression in neurons, microglia, and activated microglia

In CA1 area of control rats, flow cytometry analysis indicated that 43.3 ± 2.3% of neurons were expressing TLR4, while in EtOH-treated rats, 29.9 ± 3.0% of neurons were TLR4 immunopositive (Figure 4A). The number of TLR4-expressing neurons was thus decreased by 31% ($p = 0.006$) 48 h after EtOH. The MFI for TLR4 in neurons was 3.32 ± 0.21 a.u. in CTL and 2.66 ± 0.24 a.u. in ALC, revealing a decrease by 20% following EtOH exposure (Figure 4A; $p = 0.010$). We further investigated with immunohistochemistry TLR4 expression in neurons of the pyramidal cell layer in CA1 area and in the GZ of the DG (Figure 4B,C). EtOH exposure decreased neuronal TLR4 labeling by 60% in the CA1 (3443 ± 9.8 a.u. in CTL vs. 1368 ± 365 in ALC; $p = 0.03$) and by 55% in the DG (3425 ± 794 in CTL vs. 1528.72 ± 231 in ALC; $p = 0.02$). It is noticeable that while the number of NeuN+ cells decreased in the DG (see Figure 1), the immunofluorescent intensity of NeuN labeling in each neuron was unchanged in CA1 and DG (mean NeuN intensity in CA1 neurons is 1298 ± 128 a.u. in CTL vs. 1254 ± 132 a.u. in ALC; mean NeuN intensity in DG neurons is 1320 ± 131 in CTL vs. 1074 ± 115 in ALC). So, we normalized the fluorescence intensity, expressed in arbitrary unit, with the calculation of the ratio between TLR4 and NeuN intensity. EtOH decreased the TLR4/NeuN ratio in CA1 by 58% (2.519 ± 0. 56 in CTL vs. 1.05 ± 0.18 in ALC; $p = 0.02$) and in the DG by 47% (2.46 ± 0.42 in CTL vs. 1.31 ± 0.22 in ALC; $p = 0.02$; Figure 4B,C).

Concerning microglial cells, there was no change in the number of TLR4-expressing microglia (Figure 4D) since we found 45.5 ± 6.3% in CTL and 42.3 ± 10.4% in ALC of microglia that expressed TLR4. The intensity of this labeling was also not changed since MFI of TLR4 in microglia was 14.87 ± 3.41 a.u. in CTL versus 11.85 ± 2.66 a.u. in ALC. There was also no change in the percentage of TLR4-expressing activated microglia among all activated microglia (Figure 4E) since it was measured as 67.16 ± 8.36% in CTL versus 64.60 ± 7.94% in ALC. In addition, the intensity of the TLR4 labeling was unchanged since MFI for TLR4 in activated microglia was 20.73 ± 2.12 a.u. in CTL and

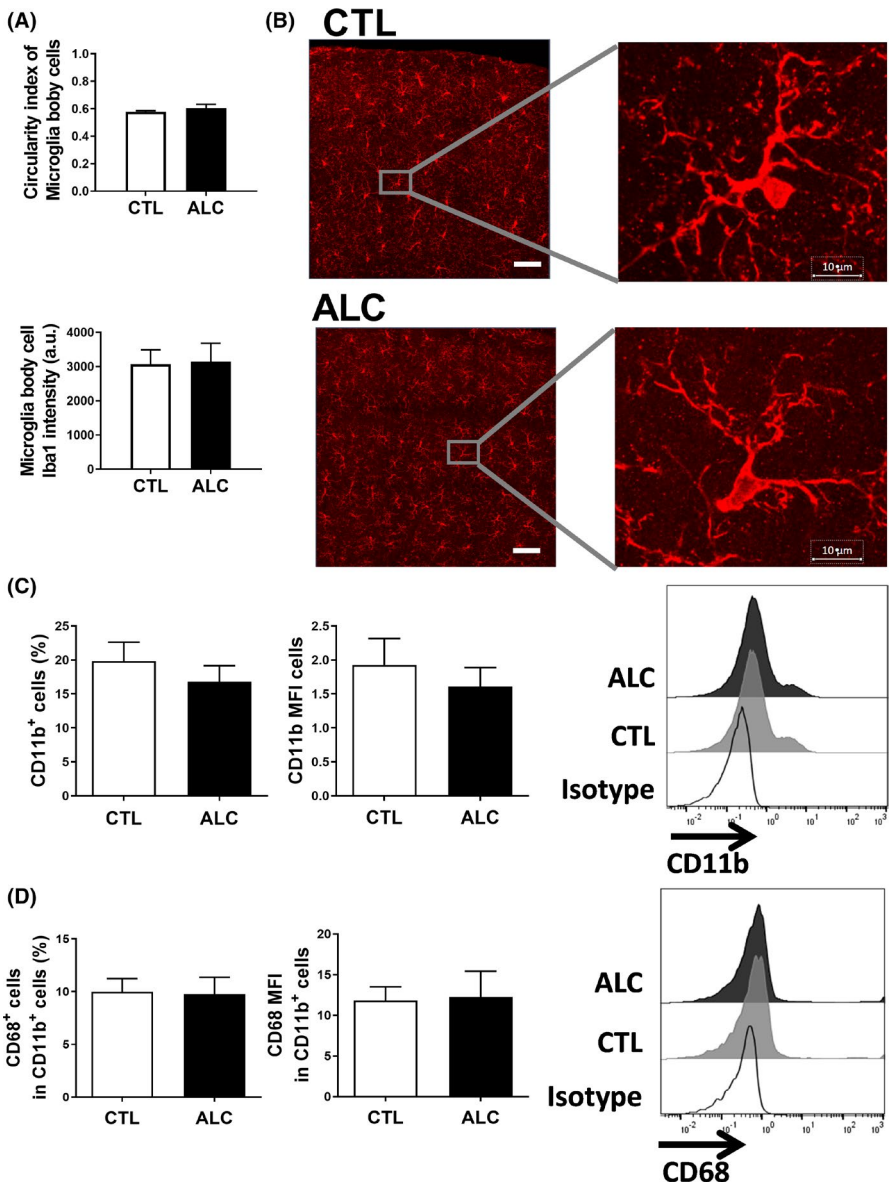


FIGURE 3 No activated microglia in CA1: Iba1 labeling, CD11b and CD68 expression. (A) Analysis of Iba1 immunofluorescence in CA1, $n = 7$ CTL and $n = 7$ ALC, 1 section per brain, each data are mean of 10 microglia cells randomly chosen in each right and left hippocampi. Neither circularity index of microglia body cell nor microglia body cell Iba1 labeling intensity was affected 48 h after the two binges. (B) Microphotographs of Iba1 immunofluorescence in the CA1, in CTL and ALC rats. (C) Flow cytometry analysis showing that EtOH exposure did not change the percentage of microglial cells (CD11b+) in CA1 in CTL and ALC ($n = 6$ rats). (D) EtOH exposure did not change the number of activated microglia cells (CD68+) in CTL and ALC ($n = 8$). The two graphs on the right illustrate CD11b+ and CD68+ labeling in one representative CA1 of CTL (grey) and ALC (black) groups. The isotype represents nonspecific labeling. a.u.: arbitrary unit

21.61 ± 2.60 a.u. in ALC. Thus, TLR4 expression in microglia was not affected 48 h after the EtOH binge-like exposure while neuronal TLR4 was decreased.

DISCUSSION

We wanted to know if the deficits in memory and synaptic plasticity in the hippocampus observed 48 h after the very first episodes of binge drinking were associated with damage to neurons, changes in TLR4 expression, or microglial reactivity in adolescent rats. Our main findings demonstrate that the SGZ displays astrogliosis and compensatory neurogenesis associated with less mature neurons in the DG and CA3. Regarding neuroinflammation, TLR4 expression is decreased in neurons and unchanged in microglia and we did not observe microglial cells reactivity. Altogether, two binges of EtOH are sufficient to induce subtle yet concrete 48 h-lasting footprints in the hippocampus, a key structure for learning and memory.

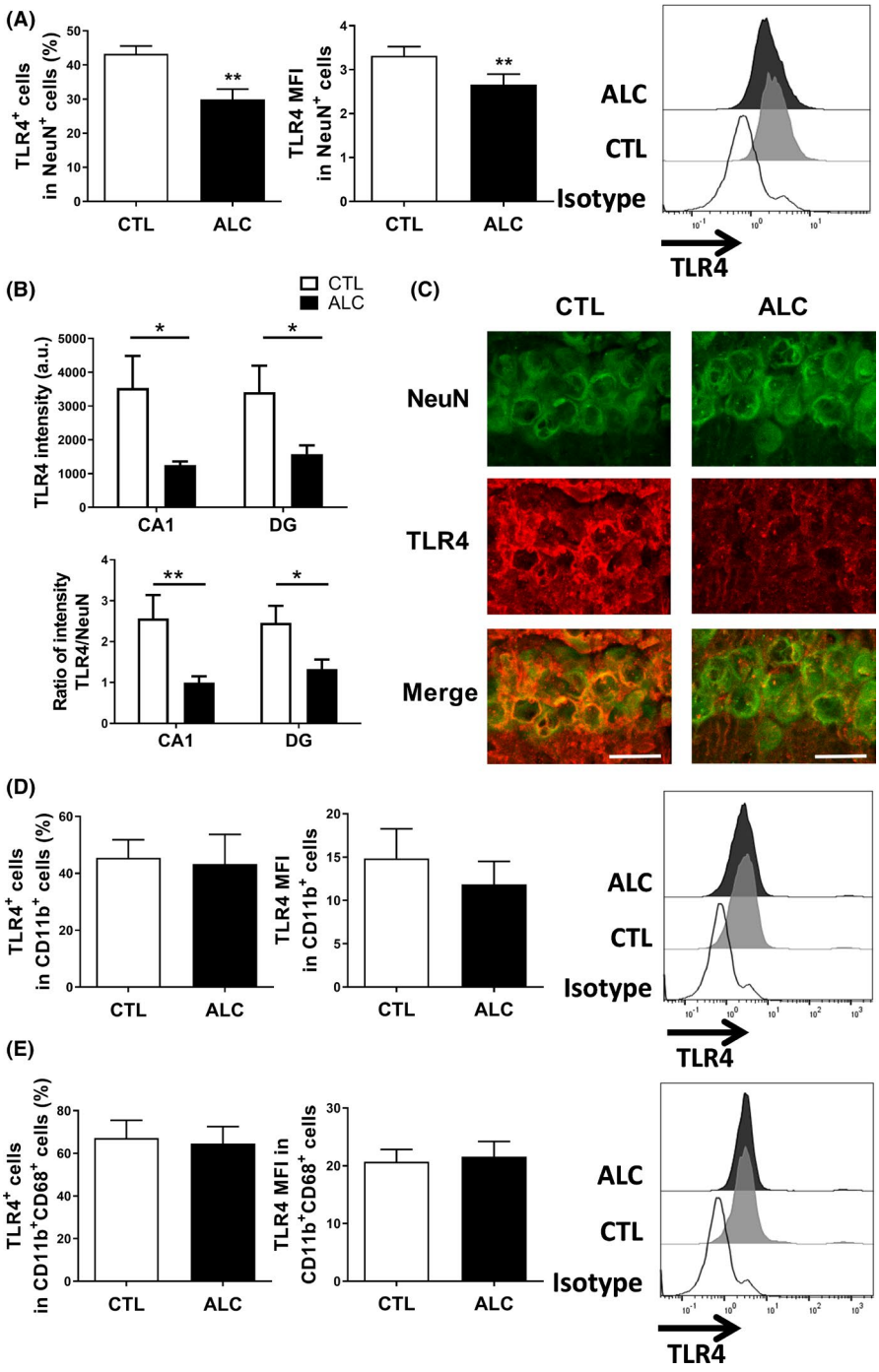


FIGURE 4 TLR4 expression in neurons, microglia, and activated microglia of isolated CA1 with flow cytometry and immunofluorescence. (A) Left: EtOH exposure decreased the percentage of TLR4-positive neurons (−31%; $p = 0.006$) ($n = 6$). Middle: the mean fluorescence intensity (MFI) of TLR4 in TLR4-expressing neurons was decrease by EtOH (−20%; $p = 0.01$). Right: neuronal TLR4 labeling of one representative CA1 in CTL and ALC (isotype is the nonspecific labeling). (B) Upper graph: TLR4 immunofluorescence intensity decreased in the *stratum pyramidale* of CA1 (−60%; $p = 0.03$) and in the granular zone of DG (−55%; $p = 0.02$) after EtOH ($n = 7$; one section per brain, data are mean of 10 neurons chosen by chance in each hippocampi) a.u.: arbitrary unit. Lower graph: TLR4/NeuN ratio decreased in CA1 (−58%; $p = 0.02$) and in DG (−47%; $p = 0.02$). (C) Microphotographs of labeling in CTL and ALC rats in *stratum pyramidale* of CA1. NeuN is green, TLR4 is red, and merge is orange. Scale bar = 100 μm D) Left: EtOH did not affect the percent of TLR4-expressing microglia among the microglia ($n = 7$). Middle: the MFI of TLR4 labeling in microglia was unchanged. Right: microglia TLR4 labeling of one representative CA1 of CTL and ALC. (E) Left: EtOH did not affect the percent of TLR4-positive cells among activated microglia ($n = 7$). Middle: the MFI of TLR4 labeling in activated microglia was unaltered after EtOH. Right: TLR4 labeling of activated microglia of one representative CA1 of CTL (grey) and ALC (black). $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$

Structural plasticity including compensatory neurogenesis after two binges of EtOH

We measured neuronal density with NeuN (neuronal nuclei) immunostaining, a specific marker of mature, postmitotic neurons (Duan et al., 2016). We found a decrease in the density of mature neurons in the granular zone and CA3 field. This decrease in the number of mature neurons was expected since EtOH is neurotoxic and reduces the number of neurons. Adult male rats subjected to a 4-day binge model modified from Majchrowicz (1975), with an EtOH diet every 8 h for 4 days leading to an average intoxication dose around 10 g/kg/day, showed an increase in cell death in the DG and CA3, 2 days after exposure (Kelso et al., 2011). Our result is thus in accordance with the literature, although we did not measure apoptosis. We revealed signs of neurogenesis in the SGZ of the DG with DCX labeling, a protein highly expressed during the maturation of newly generated neurons (Brown et al., 2003). The increase in DCX labeling 48h after the two binges in the SGZ of the DG reveals the presence of immature neurons in a zone in which new neurons are intrinsically generated. This result may appear in contradiction with other studies since the reduction in neurogenesis by EtOH has been thoroughly reported (Geil et al., 2014) in different models of EtOH exposure. These models include the Majchrowicz-modified 4-day binge exposure in adolescent male rats, which led to a decrease in DCX labeling in the SGZ after 48 h (Morris et al., 2010), but also chronic intermittent adolescent EtOH exposure for 1 month, which induce a decrease in neurogenesis at the end of the exposure and in adulthood (Sakharkar et al., 2016; Vetreno & Crews, 2015). However, the effects and the mechanism of neurogenesis inhibition may vary according to the dose of alcohol, the pattern, and the duration of exposure (Goodlett et al., 2005). Therefore, it seems that the two binge-like EtOH exposures we tested are strong enough to kill neurons and to trigger neurogenesis.

The intensity of the EtOH-induced decrease in neurogenesis has been positively correlated with deficits in object recognition memory when both are studied at adulthood (Macht et al., 2020; Vetreno & Crews, 2015). In contrast, a stimulated neurogenesis in the hippocampus is related to cognitive improvement since newborn neurons participate in the adult to memory consolidation (Vergara & Sakaguchi, 2020) or remote memory reconsolidation (Lods et al., 2021). However, it is unlikely that the present neurogenesis improves hippocampus-related cognition since we described a concomitant cognitive deficit 48 h after the same EtOH exposure (Silvestre de Ferron et al., 2015). In addition, increased neurogenesis was concomitant with the presence of less mature neurons in the granular zone of the DG. Therefore, we interpret the present neurogenesis as a compensatory mechanism following the toxic insult due to EtOH in order to replace damaged neurons but not to improve cognition at that time point. In line with this idea, a hippocampal reactive neurogenesis has been also observed in male and female adult rats exposed to the Majchrowicz-modified binge model: Reactive neurogenesis in this case began after 5 days of abstinence and showed a full recovery in granule cell number after 28 days (Hayes et al., 2018; Nawarawong et al., 2021). Reactive neurogenesis was also described in adult male mice hippocampus after 3 weeks of free alcohol intake (Stragier et al., 2015). Taken together, it is possible that reactive neurogenesis after EtOH accompanies the recovery from EtOH-induced cognitive deficits. This suggestion is supported by the fact that newborn neurons in the SGZ need 3 to 8 weeks to fully mature and to include the local network (Ge et al., 2006, 2008; Ming & Song, 2011). Furthermore, we used synaptophysin, a component of the presynaptic vesicle to determine the density of synapses and found a decrease in synaptophysin in the *stratum oriens*, the basal dendrite area of the CA1 pyramidal neurons, suggesting a local loss of synapses. However, it should be noted that a slight decrease was observed in other areas of the hippocampus as well (*stratum radiatum*, SGZ, and hilus of DG), but it was significant only in the *stratum oriens*. Therefore, we should interpret this result cautiously. Indeed, learning deficits are often associated with a reduction in synaptophysin expression by 25% to 40% in the hippocampus (Cinar et al., 2020; Veschsanit et al., 2021; Wang et al., 2021), which is, at least, the double of the reduction we found. Moreover, at that time point, there is a lack of synaptic long-term depression (LTD) in the hippocampus of alcohol-treated rats and a decrease in learning (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). This may suggest that the density of dendrites is not representative of cognitive performance in our study. Alternatively, it could be that the blockade of LTD after EtOH is due to an EtOH-induced LTD state, reflected in the decrease in the density of synapses. Altogether, the present results support the idea that learning deficits after two binges relate more to EtOH-induced alteration of functional synaptic plasticity rather than to a decrease in structural plasticity.

Astrogliosis is present after two binges

Neuroinflammation is a consequence of alcohol exposure either in a chronic way or with repetition of binge episodes (Doremus-Fitzwater et al., 2014; Pascual et al., 2018). However, the number of exposures to EtOH necessary to evoke such cellular response remains unclear. In the brain, astrocytes are reactive to several types of injury (trauma, disease, chemical insult, etc.) and respond in a typical manner, called reactive astrogliosis, whereby these cells undergo various molecular and morphological changes (Sofroniew, 2009). Such response is not only associated with rapid synthesis of GFAP, the glial fibrillary acidic protein, and is demonstrated by an increase in protein content or by GFAP immunolabeling (Eng et al., 2000) but also with synthesis of vimentin (Jiang et al., 2012). Vimentin is a type III intermediate cytoskeleton filament protein that involves in anchoring organelles into the cytosol and is a marker of immature astrocytes since vimentin labeling decrease with cellular maturation. Vimentin is also a marker for reactive astrogliosis (Kelso et al., 2011). During a neurological disease or a brain damage, astrocytes become reactive. Hence, a reactive gliosis is characterized by an increase in astrocytic GFAP and vimentin labeling, among other signals (Hol & Pekny, 2015). The present vimentin and GFAP colabeling revealed

an increase in vimentin expression 48 h after the two binges in the SGZ of the DG within GFAP-labeled cells. Astrogliosis suggests that the brain tissue is suffering from EtOH. Interestingly, reactive astrogliosis in adult rats was one- to eightfold the basal level in the hippocampus 48 h after 1 day of binging (Hayes et al., 2013). Our result is thus in the same vein. However, the age of rats was not the same and the paradigm of EtOH exposure was also different since Hayes et al. administered adult rats with a liquid diet every 8 h for 1 day, meaning the animals received three binges at a mean dose of 13.4 g/kg/day. Here, we administered EtOH only two times at 9 h interval and at a total dose of 6 g/kg/day. Therefore, blood EtOH content reached in the two studies was different: 336 mg/dl reached three times a day versus 197 mg/dl reached two times in 1 day in the present study (Silvestre de Ferron et al., 2015). In consequence, we confirm and extend previous studies by revealing a lower threshold than reported, although it cannot be ruled out that the final number of binges and the age can also play a role in the expression of some delayed effects on the brain tissue integrity. Interestingly, the presence of neurogenesis together with an astrogliosis in the SGZ of the DG suggests that compensatory neurogenesis can take place even in a context of astrogliosis. The role for astrogliosis in response to a brain damage has been suggested to be twofold: it could play a beneficial role in the acute stage of the damage and an inhibitory role on repair and functional recovery on later stage (Pekny et al., 2007). Because of the transient effect of EtOH on cognitive function and synaptic plasticity, we cannot exclude that the astrogliosis we measured has a beneficial role. However, we need more experiments to answer this question.

No microglial reactivity and no microglial changes in TLR4

EtOH acts on microglial cells (Erickson et al., 2019) which are characterized by numerous extensions allowing them to analyze their microenvironment and to react accordingly (Nimmerjahn et al., 2005; Ohsawa & Kohsaka, 2011). Microglial reactivity induced by threat detection is identifiable by morphological changes such as thickening of proximal extensions and reduction in distal ramifications (Audinat & Arnoux, 2014). These changes are observable through the expression of Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1), a protein restricted to microglia and macrophages (Crews et al., 2016; Ito et al., 1998). While adopting a reduction in distal ramification and an amoeboid shape, there is an increase in the immunofluorescence of Iba1 labeling (Bennett & Viaene, 2021). In the CA1 area, 48 h after the two binges, there were no morphologic change in microglia and no increase in the number of CD68-expressing cells, suggesting there was no increase in activated microglia. These results are in contradiction with a lot of literature indicating an increase in microglia activation after EtOH exposure (Alfonso-Loeches et al., 2010; Li et al., 2019; Marshall et al., 2020; Peng & Nixon, 2021; West et al., 2021). However, EtOH exposure in these studies includes chronic or intermittent exposure over several days. Interestingly, even in such context, some authors reported that microglial activation may not be complete after 6 months of chronic EtOH exposure (Cruz et al., 2017). We should also take into account the time point of our measurements, 48 h after the first intoxication, which was possibly late in comparison to the time course of the two acute EtOH-induced neuroinflammation. Indeed, we performed two binge-like exposures at 9 h interval to respect a period without alcohol. It is thus possible that each binge evoked a low level of neuroinflammation, which cannot be detected after 48 h. The low level of neuroinflammation can be further linked to the relative low blood EtOH content (BEC) we reached (ca. 2 g/L) in comparison with previous reported effects of EtOH at 4h delay with a 70% higher BEC level in 1 day (Hayes et al., 2013). In rodents, it has been repetitively reported that EtOH-induced neuroinflammation involves TLR4 receptor (Li et al., 2019; Montesinos et al., 2016; Pascual et al., 2018).

More precisely, EtOH exposure induces neuronal and glial expression of HMGB1, which activates TLR4 and stimulates the production of proinflammatory cytokines (Crews et al., 2015). In CA1, our experiments show a lack of increase in TLR4 expression in microglia cells, which goes along with no increase in activated microglia. This suggests that EtOH-induced activation of microglia was probably back to normal 48 h after EtOH exposure. Consequently, our results suggest that the glial consequences of TLR4 activation, that is, the release of cytokine, are minimal 48h after the two binges.

Decreased neuronal TLR4 expression

We found that TLR4 expression in CA1 neurons decreased below control level 48h after EtOH exposure, suggesting that the two binges of EtOH down-regulate the expression of TLR4 in neurons. To our knowledge, this effect of EtOH has never been reported before. It is known that TLR4 is expressed in hippocampal neurons (Li et al., 2015) and that TLR4 signaling pathways differ between neurons and other cellular types such as astrocytes, microglia, cells neural progenitor, or dendritic cells (Leow-Dyke et al., 2012; Okun et al., 2011). TLR4 modulates hippocampus-dependent learning, but as these experiments were conducted either on TLR4 KO mice or in TLR4 antagonist-treated mice, no clue are yet provided if this effect comes from neuronal and/or nonneuronal TLR4 (Connolly et al., 2021; Okun et al., 2012).

LPS induced a strong inflammatory response in adult rat hippocampal microglia associated with a concomitant up-regulation of TLR4 in CA1 pyramidal and hilar neurons, while TLR4 signaling reduced Ih current, therefore increasing neuronal excitability (Frigerio et al., 2018).

In the rat DG, neuronal TLR4 increased after fluid percussion injury, while electrophysiological records showed that TLR4 activation enhanced dentate network excitability in injured rats (Korgaonkar et al., 2020a; Li et al., 2015). As AMPA currents in neuronal cultures depleted of glia were enhanced by agonists

of TLR4 and reduced by TLR4 antagonists, it was believed that neuronal TLR4 signaling enhances excitability in the injured brain (Korgaonkar et al., 2020b). These experiments suggest that neuronal TLR4 modulates dentate excitability. However, Korgaonkar et al. underlined the "Janus faced" effects of TLR4 on dentate excitability: TLR4 activation enhances dentate network excitability after brain injury but limits dentate network excitability in sham rats. As the authors mention, it could be due to differential recruitment of glial versus neuronal signaling. Globally, neuronal TLR4 signaling is predominant in pathological situation, at least in adult rats, underlying an increased excitability in the DG (Korgaonkar et al., 2020b). However, these studies concerned early posttraumatic injury events and reveal modulation of neuronal excitability by TLR4 signaling in the DG only, while our present observation concerned the CA1 area. Altogether, it appears possible that the neuronal decrease in TLR4 expression 48h after two binge-like exposure decreases the excitability of hippocampus CA1 neurons, therefore disturbing synaptic plasticity. However, answering such question will require specific experiments.

CONCLUSION

Our results reveal that several cellular mechanisms are operating over 48 h after only two binges of EtOH in adolescent hippocampus and that brain tissue is still suffering 48 h after the EtOH insult. Increased neurogenesis should represent the physiological response of the brain to a short-lasting toxic insult that includes reparation processes while astrogliosis could participate also in brain repair. As no microglial reactivity or microglial TLR4 increase was recorded, neuroinflammation is probably not the main actor directly responsible for the cognitive deficits induced at the 48 h delay after the two binges. However, modulation of neuronal TLR4 could be related to synaptic plasticity disturbances observed in CA1 following few binge-like EtOH exposure.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Catherine Vilpoux https://orcid.org/0000-0003-2462-2878
Philippe Gosset https://orcid.org/0000-0002-9104-8688
Ingrid Marcq https://orcid.org/0000-0002-4031-224X
Mickael Naassila https://orcid.org/0000-0002-9788-0918
Olivier Pierrefiche https://orcid.org/0000-0003-1427-9332

REFERENCES

Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C. et al. (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 67, 521–531. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.007

Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A.M., Sanchez-Vera, I. & Guerri, C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *Journal of Neuroscience*, 30, 8285–8295. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010

Amodeo, L.R., Wills, D.N., Sanchez-Alavez, M., Nguyen, W., Conti, B. & Ehlers, C.L. (2018) Intermittent voluntary ethanol consumption combined with ethanol vapor exposure during adolescence increases drinking and alters other behaviors in adulthood in female and male rats. *Alcohol*, 73, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.04.003

Audinat, É. & Arnoux, I. (2014) La microglie: Des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *Medecine/Sciences*, 30, 153–159. https://doi.org/10.1051/medsci/20143002012

Bennett, M.L. & Viaene, A.N. (2021) What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration? *Neurobiology of Diseases*, 148, 105172. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105172

Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L. & Kuhn, H.G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 467, 1–10. https://doi.org/10.1002/cne.10874

Carbia, C., Cadaveira, F., Caamaño-Isorna, F., Rodríguez-Holguín, S. & Corral, M. (2017) Binge drinking during adolescence and young adulthood is associated with deficits in verbal episodic memory. *PLoS One*, 12, e0171393. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171393

Cinar, E., Yalcin-Cakmakli, G., Saka, E., Ulusoy, A., Yuruker, S., Elibol, B. et al. (2020) Modelling cognitive deficits in Parkinson's disease: is CA2 a gateway for hippocampal synucleinopathy? *Experimental Neurology*, 330, 113357. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113357

Connolly, M.G., Potter, O.V., Sexton, A.R. & Kohman, R.A. (2021) Effects of Toll-like receptor 4 inhibition on spatial memory and cell proliferation in male and female adult and aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 97, 383–393. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.06.008

Crews, F.T., Sarkar, D.K., Qin, L., Zou, J., Boyadjieva, N. & Vetreno, R.P. (2015) Neuroimmune function and the consequences of alcohol exposure. *Alcohol Research: Current Reviews*, 37, 331–341, 344–351.

Crews, F.T. & Vetreno, R.P. (2014) Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *International Review of Neurobiology*, 118, 315–357. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5

Crews, F.T., Vetreno, R.P., Broadwater, M.A. & Robinson, D.L. (2016) Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacological Reviews*, 68, 1074–1109. https://doi.org/10.1124/pr.115.012138

Cruz, C., Meireles, M. & Silva, S.M. (2017) Chronic ethanol intake induces partial microglial activation that is not reversed by long-term ethanol withdrawal in the rat hippocampal formation. *Neurotoxicology*, 60, 107–115. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.04.005

Doremus-Fitzwater, T.L., Buck, H.M., Bordner, K., Richey, L., Jones, M.E. & Deak, T. (2014) Intoxication- and withdrawal-dependent expression of central and peripheral cytokines following initial ethanol exposure. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 38, 2186–2198. https://doi.org/10.1111/acer.12481

Drissi, I., Deschamps, C., Fouquet, G., Alary, R., Peineau, S., Gosset, P. et al. (2020) Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addiction Biology*, 25, e12760. https://doi.org/10.1111/adb.12760

Duan, W., Zhang, Y.-P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C.-Q. et al. (2016) Novel Insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Molecular Neurobiology*, 53, 1637–1647. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5

Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25, 1439–1451. https://doi.org/10.1007/s00429-016-1196-y

Englund, M.M., Egeland, B., Oliva, E.M. & Collins, W.A. (2008) Childhood and adolescent predictors of heavy drinking and alcohol use disorders in early adulthood: a longitudinal developmental analysis. *Addiction*, 103, 23–35. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2008.02174.x

Erickson, E.K., Grantham, E.K., Warden, A.S. & Harris, R.A. (2019) Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 177, 34–60. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.007

Escartin, C., Guillemaud, O. & Carrillo-de Sauvage, M.-A. (2019) Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67, 2221–2247. https://doi.org/10.1002/glia.23687

Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. & Guerri, C. (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *The Journal of Immunology*, 1950(183), 4733–4744. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803590

Frigerio, F., Flynn, C., Han, Y., Lyman, K., Lugo, J.N., Ravizza, T. et al. (2018) Neuroinflammation Alters Integrative Properties of Rat Hippocampal Pyramidal Cells. *Molecular Neurobiology*, 55, 7500–7511.

García-Moreno, L.M., Expósito, J., Sanhueza, C. & Angulo, M.T. (2008) Prefrontal activity and weekend alcoholism in the young. *Adicciones*, 20, 271–279.

Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G. & Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589–593. https://doi.org/10.1038/nature04404

Ge, S., Sailor, K.A., Ming, G. & Song, H. (2008) Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *Journal of Physiology*, 586, 3759–3765. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155655

Geil, C.R., Hayes, D.M., McClain, J.A., Liput, D.J., Marshall, S.A., Chen, K.Y. et al. (2014) Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: promiscuous drug, wanton effects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.05.003

Goodlett, C.R., Horn, K.H. & Zhou, F.C. (2005) Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental Biology and Medicine*, 230, 394–406. https://doi.org/10.1177/15353702-0323006-07

Guerri, C. & Pascual, M. (2019) Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 77, 89–98. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006

Hayes, D.M., Deeny, M.A., Shaner, C.A. & Nixon, K. (2013) Determining the threshold for alcohol-induced brain damage: new evidence with gliosis markers. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 37, 425–434. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01955.x

Hayes, D.M., Nickell, C.G., Chen, K.Y., McClain, J.A., Heath, M.M., Deeny, M.A. et al. (2018) Activation of neural stem cells from quiescence drives reactive hippocampal neurogenesis after alcohol dependence. *Neuropharmacology*, 133, 276–288. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.032

He, J., Nixon, K., Shetty, A.K. & Crews, F.T. (2005) Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2711–2720. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04120.x

Hol, E.M. & Pekny, M. (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. & Kohsaka, S. (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57, 1–9. https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0

Jennison, K.M. (2004) The short-term effects and unintended long-term consequences of binge drinking in college: a 10-year follow-up study. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 30, 659–684. https://doi.org/10.1081/ADA-200032331

Jiang, S.X., Slinn, J., Aylsworth, A. & Hou, S.T. (2012) Vimentin participates in microglia activation and neurotoxicity in cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 122(4), 764–774.

Kelso, M.L., Liput, D.J., Eaves, D.W. & Nixon, K. (2011) Upregulated vimentin suggests new areas of neurodegeneration in a model of an alcohol use disorder. *Neuroscience*, 197, 381–393. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.019

Korgaonkar, A.A., Li, Y., Sekhar, D., Subramanian, D., Guevarra, J., Swietek, B. et al. (2020a) TLR4 signaling in neurons enhances calcium-permeable AMPAR currents and drives post-traumatic epileptogenesis. *Annals of Neurology*, 87, 497–515. https://doi.org/10.1002/ana.25698

Korgaonkar, A.A., Nguyen, S., Li, Y., Sekhar, D., Subramanian, D., Guevarra, J. et al. (2020b) Distinct cellular mediators drive the Janus faces of toll-like receptor 4 regulation of network excitability which impacts working memory performance after brain injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 381–395. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.035

Leow-Dyke, S., Allen, C., Denes, A., Nilsson, O., Maysami, S., Bowie, A.G. et al. (2012) Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 230. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-230

Li, Q., Liu, D., Pan, F., Ho, C.S.H. & Ho, R.C.M. (2019) Ethanol exposure induces microglia activation and neuroinflammation through TLR4 activation and SENP6 modulation in the adolescent rat hippocampus. *Neural Plasticity*, 2019, 1648736. https://doi.org/10.1155/2019/1648736

Li, Y., Korgaonkar, A.A., Swietek, B., Wang, J., Elgammal, F.S., Elkabes, S. et al. (2015) Toll-like receptor 4 enhancement of non-NMDA synaptic currents increases dentate excitability after brain injury. *Neurobiology of Diseases*, 74, 240–253. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.021

Lods, M., Pacary, E., Mazier, W., Farrugia, F., Mortessagne, P., Masachs, N. et al. (2021) Adult-born neurons immature during learning are necessary for remote memory reconsolidation in rats. *Nature Communications*, 12, 1778. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22069-4

Macht, V., Crews, F.T. & Vetreno, R.P. (2020) Neuroimmune and epigenetic mechanisms underlying persistent loss of hippocampal neurogenesis following adolescent intermittent ethanol exposure. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.10.007

Majchrowicz, E. (1975) Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia*, 43, 245–254. https://doi.org/10.1007/BF00429258

Marshall, S.A., McClain, J.A., Wooden, J.I. & Nixon, K. (2020) Microglia dystrophy following binge-like alcohol exposure in adolescent and adult male rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 52. https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00052

McCambridge, J., McAlaney, J. & Rowe, R. (2011) Adult consequences of late adolescent alcohol consumption: a systematic review of cohort studies. *PLoS Med*, 8, e1000413. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000413

Ming, G. & Song, H. (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70, 687–702. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001

Mitani, Y., Yarimizu, J., Saita, K., Uchino, H., Akashiba, H., Shitaka, Y. et al. (2012) Differential effects between -secretase inhibitors and

modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 32, 2037–2050. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4264-11.2012

Montesinos, J., Alfonso-Loeches, S. & Guerri, C. (2016) Impact of the innate immune response in the actions of ethanol on the central nervous system. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40, 2260–2270. https://doi.org/10.1111/acer.13208

Morris, S.A., Eaves, D.W., Smith, A.R. & Nixon, K. (2010) Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*, 20, 596–607. https://doi.org/10.1002/hipo.20665

Nawarawong, N.N., Thompson, K.R., Guerin, S.P., Anasooya Shaji, C., Peng, H. & Nixon, K. (2021) Reactive, adult neurogenesis from increased neural progenitor cell proliferation following alcohol dependence in female rats. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 689601. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.689601

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314–1317. https://doi.org/10.1515/nf-2005-0304

Ohsawa, K. & Kohsaka, S. (2011) Dynamic motility of microglia: purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia*, 59, 1793–1799. https://doi.org/10.1002/glia.21238

Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S.M., Griffioen, K.J., Roberts, N. et al. (2012) Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory. *PLoS One*, 7, e47522. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047522

Okun, E., Griffioen, K.J. & Mattson, M.P. (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in Neurosciences*, 34, 269–281. https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005

Pascual, M., Baliño, P., Aragón, C.M.G. & Guerri, C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*, 89, 352–359. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.014

Pascual, M., Montesinos, J. & Guerri, C. (2018) Role of the innate immune system in the neuropathological consequences induced by adolescent binge drinking. *Journal of Neuroscience Research*, 96, 765–780. https://doi.org/10.1002/jnr.24203

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestål, Y.R. & Pekna, M. (2007) The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *International Review of Neurobiology*, 82, 95–111. https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82005-8

Peng, H. & Nixon, K. (2021) Microglia phenotypes following the induction of alcohol dependence in adolescent rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 45, 105–116. https://doi.org/10.1111/acer.14504

Rae, C.L., Gierski, F., Smith, K.W., Nikolaou, K., Davies, A., Critchley, H.D. et al. (2020) Differential brain responses for perception of pain during empathic response in binge drinkers compared to non-binge drinkers. *NeuroImage Clinical*, 27, 102322. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102322

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

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 Structure and Function*, 221, 4691–4703. https://doi.org/10.1007/s00429-016-1196-y

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Silvestre de Ferron, B., Bennouar, K.-E., Kervern, M., Alaux-Cantin, S., Robert, A., Rabiant, K. et al. (2015) Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19, pyv087. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv087

Smith, K.W., Gierski, F., Andre, J., Dowell, N.G., Cercignani, M., Naassila, M. et al. (2017) Altered white matter integrity in whole brain and segments of corpus callosum, in young social drinkers with binge drinking pattern. *Addiction Biology*, 22, 490–501. https://doi.org/10.1111/adb.12332

Sofroniew, M.V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32, 638–647. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002

Spear, L.P. (2018) Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 19, 197–214. https://doi.org/10.1038/nrn.2018.10

Spilka, S., Le Nézet, O., Janssen, E., Brissot, A., Phillipon, A., Shah, J. & Chyderiotis, S. (2018) Les drogues à 17 ans : analyse de l'enquête ESCAPAD 2017 - Tendances 123 - février 2018 - OFDT [WWW Document]. Httpswwwofdtfrpublicationscollectionsperiodiquesllettre-Tend.-Drogue-17--Anal.--Lenquete-Escapad-2017-Tend.-123-Fevrier-2018. https://www.ofdt.fr/publications/collections/periodiques/lettre-tendances/les-drogues-17-ans-analyse-de-lenquete-escapad-2017-tendances-123-fevrier-2018/ [accessed 91520]

Stogsdill, J.A. & Eroglu, C. (2017) The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.09.016

Stragier, E., Massart, R., Salery, M., Hamon, M., Geny, D., Martin, V. et al. (2015) Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Molecular Psychiatry*, 20, 405–412. https://doi.org/10.1038/mp.2014.38

Tavolacci, M.-P., Berthon, Q., Cerasuolo, D., Dechelotte, P., Ladner, J. & Baguet, A. (2019) Does binge drinking between the age of 18 and 25 years predict alcohol dependence in adulthood? A retrospective case-control study in France. *British Medical Journal Open*, 9, e026375. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026375

Tavolacci, M.-P., Boerg, E., Richard, L., Meyrignac, G., Dechelotte, P. & Ladner, J. (2016) Prevalence of binge drinking and associated behaviours among 3286 college students in France. *BMC Public Health*, 16, 178. https://doi.org/10.1186/s12889-016-2863-x

Vargas, W.M., Bengston, L., Gilpin, N.W., Whitcomb, B.W. & Richardson, H.N. (2014) Alcohol binge drinking during adolescence or dependence during adulthood reduces prefrontal myelin in male rats. *Journal of Neuroscience*, 34, 14777–14782. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3189-13.2014

Vergara, P. & Sakaguchi, M. (2020) Mechanisms underlying memory consolidation by adult-born neurons during sleep. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 594401. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.594401

Veschsanit, N., Yang, J.-L., Ngampramuan, S., Viwatpinyo, K., Pinyomahakul, J., Lwin, T. et al. (2021) Melatonin reverts methamphetamine-induced learning and memory impairments and hippocampal alterations in mice. *Life Sciences*, 265, 118844. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118844

Vetreno, R.P. & Crews, F.T. (2015) Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 35. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00035

Wang, F., Wei, X.-X., Chang, L.-S., Dong, L., Wang, Y.-L. & Li, N.-N. (2021) Ultrasound combined with microbubbles loading BDNF retrovirus to open bloodbrain barrier for treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 615104. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.615104

Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J. et al. (2010) Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, 35, 913–928. https://doi.org/10.1038/npp.2009.193

West, R.K., Rodgers, S.P. & Leasure, J.L. (2021) Neural perturbations associated with recurrent binge alcohol in male and female rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 45, 365–374. https://doi.org/10.1111/acer.14529

Zinchuk, V. & Grossenbacher-Zinchuk, O. (2009) Recent advances in quantitative colocalization analysis: focus on neuroscience. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 125–172. https://doi.org/10.1016/j.proghi.2009.03.001

How to cite this article: Vilpoux, C., Fouquet, G., Deschamps, C., Lefebvre, E., Gosset, P., Antol, J., et al (2022) Astrogliosis and compensatory neurogenesis after the first ethanol binge drinking-like exposure in the adolescent rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 46, 207–220. Available from: https://doi.org/10.1111/acer.14757

DISCUSSION

Ce travail de thèse a été consacré à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les effets d'un faible nombre d'alcoolisations répétées de type *binge drinking* sur les processus mnésiques chez le rat adolescent. Deux hypothèses ont été testées pour expliquer les effets observés de l'éthanol : une première concernait l'étude des mécanismes épigénétiques, et la seconde concernait les processus neuroinflammatoires. Dans un premier temps, nos résultats ont confirmé nos études précédentes qui révélaient une perturbation mnésique dans un test de reconnaissance de nouvel objet accompagnée d'une abolition de la DLT et d'une augmentation de la PLT dans l'aire CA1 de l'hippocampe, 48h après deux épisodes de type *binge drinking* (EtOH 3g/kg, i.p.) administrés à 9h d'intervalle chez le rat en fin d'adolescence (P45-P55). De plus, ces perturbations s'accompagnaient dans CA1 d'une augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE spécifiquement issu des récepteurs NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B (Silvestre de Ferron et al., 2015).

Concernant la piste épigénétique, les résultats obtenus par la technique de cytométrie en flux montrent une augmentation significative de l'expression de l'histone désacétylase de type 2 (HDAC2) au niveau neuronal dans l'aire CA1 de l'hippocampe, 48h après les deux épisodes de *binge drinking*. D'autre part, l'analyse immunohistochimique du niveau d'Ac-H4 montrait une diminution 48h après les deux *binges*, alors que le niveau d'Ac-H3 restait inchangé. Dans ce contexte, nous avons observé que l'administration de butyrate de sodium (NaB), un inhibiteur des HDAC de classe I et IIa, 30 minutes avant chaque épisode d'intoxication éthylique prévenait l'augmentation de HDAC2 et la diminution de Ac-H4 induites par l'éthanol ainsi que les autres effets de l'éthanol : les déficits d'apprentissage, les modifications électrophysiologiques de DLT et l'implication plus importante de la sous-unité GluN2B dans le PPSE-NMDA ainsi que sa surexpression. De plus, les effets délétères de l'éthanol sur la DLT ont également été prévenus par l'administration de TSA, un inhibiteur des HDAC de classe I et II. Ainsi, nos résultats suggèrent que des modifications épigénétiques sont impliquées dans les effets délétères qui apparaissent 48h après seulement deux épisodes de *binge drinking* sur les processus mnésiques hippocampo-dépendants chez le rat adolescent (Figure 20).

La seconde hypothèse testée concernait l'implication possible de la neuroinflammation dans ces atteintes cognitives. Nos résultats obtenus 48h après les deux épisodes de type *binge drinking* ont montré une absence d'effet de l'éthanol sur les niveaux

d'ARNm de certaines cytokines pro- ou anti-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IFN-γ et TGF-β) alors que notre étude immunohistochimique a révélé une diminution de l'expression neuronale du récepteur TLR4 dans le champ CA1. Cependant, l'analyse morphologique de la microglie dans cette étude, indiquait que ces cellules n'avaient pas adopté un phénotype de cellule activée. Ces résultats suggèrent ainsi qu'il n'y a pas de signes de neuroinflammation 48h après les deux épisodes de *binge*. Toutefois et de façon intéressante, la diminution de l'expression de TLR4 a été prévenue par l'administration de minocycline, 30 minutes avant l'éthanol. De manière similaire, la minocycline prévenait également les effets négatifs des deux intoxications éthyliques sur la mémoire et sur la plasticité synaptique dans l'hippocampe ainsi que sur l'augmentation de la sensibilité du PPSE-NMDA à l'antagoniste de la sous-unité GluN2B. De manière importante, cet effet préventif a également été retrouvé avec deux autres substances : l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien, et un antagoniste spécifique de TLR4, le TAK-242. Ces résultats suggèrent ainsi que des mécanismes neuroinflammatoires participent aux dommages induits par les deux épisodes de type *binge drinking* à l'adolescence mais que probablement, ceux-ci ne persistent pas jusqu'à 48h post-alcoolisations (Figure 20).

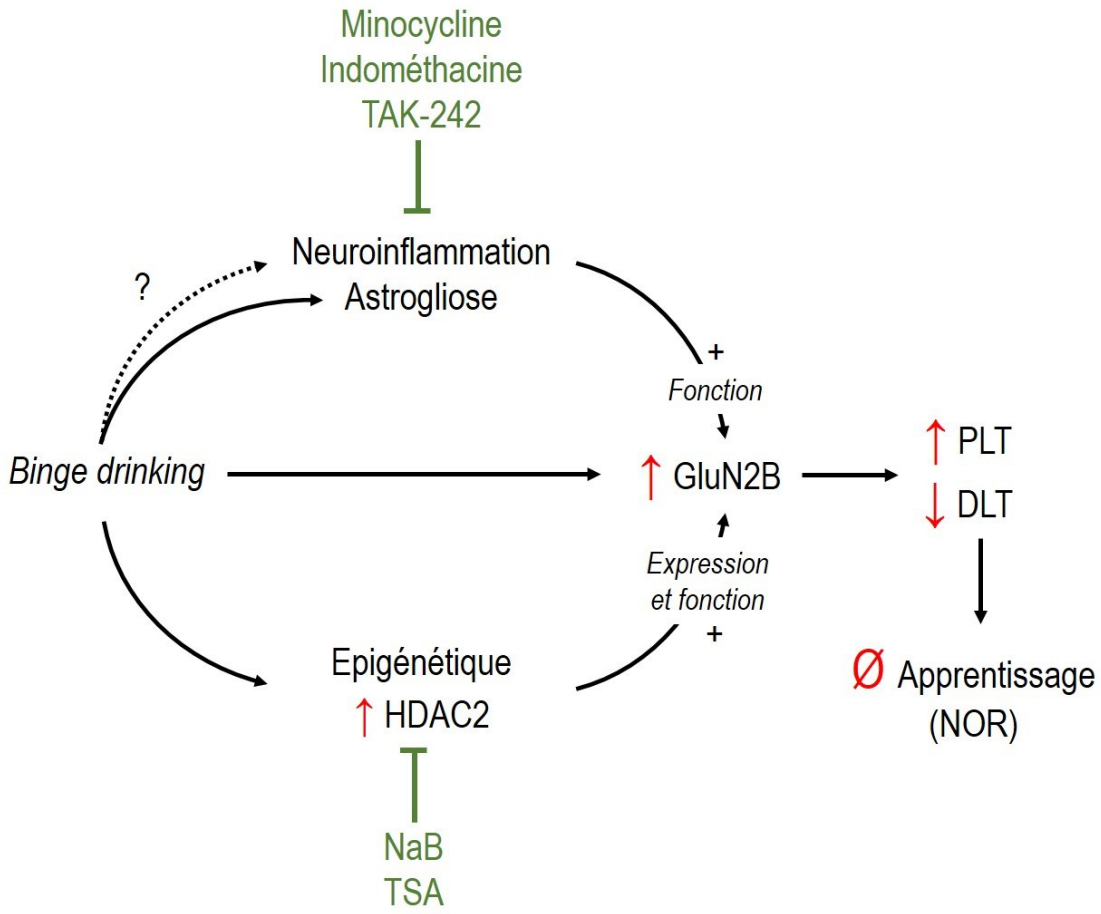


Figure 20 : **Schéma de synthèse des résultats obtenus lors de ce travail de thèse.** 48h après deux épisodes de type binge drinking chez le rat adolescent, l'expression et la fonctionnalité de la sous-unité GluN2B sont augmentées, entrainant une augmentation de l'amplitude de la PLT et une abolition de la DLT dans CA1 accompagnées d'une perturbation cognitive dans le test de reconnaissance de nouvel objet. Ces perturbations s'accompagnent d'une astrogliose dans le GD et d'une augmentation de HDAC2 dans CA1. L'ensemble de ces effets sont prévenus par l'administration, 30 minutes avant chaque épisode de binge, de l'antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires, la minocycline ; de l'inhibiteur non-sélectif des COX, l'indométhacine ; de l'antagoniste du récepteur TLR4, TAK-242 ou d'un inhibiteur des HDAC de classe I et IIa (NaB ou TSA), confirmant que des mécanismes neuroinflammatoires et épigénétiques participent aux effets délétères de l'éthanol sur les processus mnésiques hippocampo-dépendants.

I- Les effets d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol sur les processus mnésiques hippocampo-dépendants et le récepteur NMDA

1- Choix du modèle d'exposition à l'éthanol

Ce travail de thèse s'est inscrit dans la continuité des travaux ayant donné lieu à la publication de Silvestre de Ferron et collaborateurs en 2015, qui visaient à déterminer l'impact d'un faible nombre d'intoxications éthyliques sur les processus mnésiques dans l'hippocampe au cours de la période adolescente. Le but final était double : d'une part nous souhaitions répondre aux jeunes qui sont souvent persuadés que s'intoxiquer de temps en temps n'a pas d'impact sur les fonctions cérébrales (notamment la mémoire) et d'autre part, nous voulions définir les mécanismes cellulaires évoqués dès les premières expositions répétées à l'alcool responsables des perturbations mnésiques et qui pourraient être les phénomènes de base de problèmes cognitifs plus importants si les intoxications éthyliques sont répétées pendant une longue période. Ainsi, exposer des rats adolescents à un faible nombre d'intoxications à l'éthanol est une modélisation des premières expositions répétées à l'alcool que la jeune population peut rencontrer. Dans ce contexte se pose nécessairement la question de la possible transposition à l'Homme du modèle d'alcoolisation de type *binge drinking* que nous avons utilisé chez le rat. Dans nos études, des prélèvements sanguins réalisés 30 minutes après la première administration i.p. d'éthanol 20% à la dose de 3g/kg chez le rat adolescent révèlent en moyenne une éthanolémie proche de 2g/L (Silvestre de Ferron et al., 2015). Cette éthanolémie que nous souhaitions atteindre est communément mesurée dans les modèles murins utilisés pour étudier les effets de l'alcoolisation de type *binge drinking* (Pascual et al., 2007 ; Montesinos et al., 2017). Elle est également comparable aux éthanolémies mesurées lors d'un épisode ponctuel de *binge drinking* (1 à 4g/L) chez des jeunes adultes et qui entraine des répercussions structurales à distance de l'alcoolisation (Hua et al. 2020). En dehors de l'éthanolémie, une autre contrainte dans la mise en place d'un modèle expérimental de *binge drinking* réside dans le choix de la fréquence des épisodes d'alcoolisation et donc de

l'intervalle de temps entre les deux épisodes de type *binge drinking*. Dans ce contexte, il faut garder en mémoire que le rat élimine l'éthanol à hauteur de 0,3g/kg/h en moyenne (Livy et al. 2003). Ainsi, pour une éthanolémie de 2g/L, il faudra en moyenne 6,7h pour que le rat élimine l'éthanol. Chez l'Homme, le taux d'élimination de l'éthanol est situé entre 0,1 et 0,15g/kg/h. Ainsi, pour éliminer un niveau similaire d'éthanolémie, l'Homme aura besoin de 17h en moyenne. Dans la mesure où le rat élimine l'éthanol 2 à 3 fois plus rapidement que l'Homme, deux épisodes d'alcoolisation espacés de 9h chez le rat correspondront, de manière simplifiée, à deux épisodes d'alcoolisation espacés de 24h, soit une intoxication éthylique deux soirs consécutifs. A ce propos, l'étude de Crego et coll. (2010) montre que les étudiants s'adonnent principalement à une consommation d'alcool de type *binge drinking* les jeudi, vendredi et samedi (Crego et al. 2010). Ainsi, la modélisation animale d'alcoolisation de type *binge drinking* utilisée dans ce travail de thèse reste cohérente avec la modalité de consommation d'éthanol retrouvée dans la jeune population humaine.

Les modèles précliniques de *binge drinking* s'articulent autour de trois voies principales d'administration de l'éthanol : la voie intra-péritonéale (i.p.), la voie intra-gastrique (i.g.) et la voie orale (p.os.). Concernant cette dernière, elle peut être de deux types : passive ou volontaire. Dans ce contexte et comme souligné par notre laboratoire dans une publication récente, le choix de la modalité de consommation d'éthanol repose sur la question scientifique posée, dans la mesure où l'administration passive d'éthanol n'induit pas nécessairement les mêmes modifications comportementales et neurobiologiques (Jeanblanc et al. 2019). Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé une modalité d'administration d'éthanol forcée par voie i.p., de façon à atteindre une éthanolémie importante en un temps très court accompagnée de signes d'intoxication. Ce choix est en adéquation avec notre question scientifique qui concerne les effets de seulement deux épisodes de type binge drinking sur les processus mnésiques dans l'hippocampe. D'autre part, nos travaux n'entrent pas directement dans la problématique des TUA dans lesquels les aspects motivationnels ont un rôle important. D'ailleurs, nous serions incapables d'étudier les effets de seulement deux alcoolisations de type *binge drinking* chez le rat adolescent à l'aide d'un modèle de consommation volontaire d'éthanol dans la mesure où ces protocoles sont longs à mettre en place et que donc, nous serions à la fois chez l'adulte et non plus à l'adolescence, et bien au

dessus de deux expositions à l'éthanol. Puisque l'alcoolisation est forcée, nous avons veillé à utiliser la formule rédactionnelle « de type *binge drinking* » dans ce manuscript de thèse.

Finalement, il est à noter que ce travail de thèse s'intéresse aux effets du double *binge* chez le rat mâle adolescent. Dans la mesure où des différences homme/femme ont été mises en évidence dans le champ de l'alcool (Petit et al. 2013; Smith et al. 2017; Vinader-Caerols et al. 2017; Pascual et al. 2017), il est fortement recommandé par la communauté scientifique aujourd'hui d'inclure les femelles dans les études précliniques. L'étude des effets de deux épisodes de type *binge drinking* chez la femelle adolescente a fait l'objet d'une étude à part entière dans notre laboratoire et a révélé d'intéressantes différences comparativement aux mâles. En effet, nous avons montré que l'abolition de la DLT apparaissait plus précocémment, dès 24h, chez la femelle et seulement si l'administration d'éthanol avait lieu pendant la phase de proestrus du cycle ovarien, suggérant que cette différence de sensibilité chez la femelle serait due à la concomittance entre l'éthanol et les oestrogènes (Rabiant et al. 2021). Nous montrons toutefois et similairement aux mâles un rôle de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA. Ainsi, nos études se sont focalisées sur les mâles du fait de la complexité de tenir compte du cycle ovarien chez les femelles et de leur réponse plus précoce. Cependant, puisqu'il semble que la même sous-unité soit responsable des mêmes effets chez la femelle, il serait intéressant d'évaluer si ces effets chez la femelle sont également relayés par des mécanismes épigénétiques et/ou neuroflammatoires.

2- Ethanol, mémoire et plasticité synaptique dans l'hippocampe

a) Effets de l'éthanol sur les processus cognitifs

Nos travaux révèlent une perturbation de l'apprentissage dans le test de reconnaissance de nouvel objet 48h après seulement deux épisodes de type *binge drinking*. Les effets d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol sur les performances mnésiques hippocampo-dépendantes de rongeurs avait déjà été rapporté par plusieurs équipes et dans différents contextes. En effet, des études ont montré que l'éthanol influençait les capacités

d'apprentissage au moment de l'alcoolisation, on parle alors de phénomènes de *black-outs*. Ainsi, Wright et collaborateurs ont rapporté en 2003 une perturbation mnésique dans le test de piscine de Morris suite à l'administration i.p. d'éthanol à 1,5 ou 2g/kg, 25 minutes avant chaque session d'entraînement chez le rat adulte (Wright et al. 2003). De même, Ryabinin et collaborateurs avaient rapporté une perturbation de l'apprentissage dans le test de reconnaissance de nouvel objet suite à une seule administration d'éthanol à 2,4g/kg en i.p. à l'âge de 63 jours 2 minutes avant la phase d'apprentissage. En revanche, cet effet délétère de l'éthanol sur les processus mnésiques n'était pas retrouvé lorsque les souris avaient reçu une dose de 1,6g/kg (Ryabinin et al. 2002). Concernant les effets d'un faible nombre d'expositions à l'alcool durant l'adolescence, une perturbation de la mémoire de peur conditionnée liée à un indice contextuel a été rapportée lorsque la phase de conditionnement du test était réalisée 15 minutes après une administration d'éthanol 2g/kg, i.p. à l'âge de 3, 5 ou 7 semaines (Hefner and Holmes 2007). Ainsi, ces résultats montrent un effet délétère de l'éthanol sur les processus cognitifs au moment où l'éthanol est présent dans l'organisme, et ceci dès les premières expositions, mais ils suggèrent également un effet de la dose d'éthanol administrée et donc de l'éthanolémie atteinte dans l'apparition des déficits cognitifs. Ces résultats soulèvent également la question du délai entre alcoolisation et procédures d'apprentissage dans l'observation des perturbations cognitives puisque dans les études précédemment citées, la phase d'apprentissage est réalisée lorsque l'animal est sous l'influence de l'éthanol. Dans ce contexte, nous pouvons nous poser la question des effets cognitifs à distance de l'intoxication éthylique et de savoir quels mécanismes se mettent en place pour relayer ces effets. De manière intéressante, les travaux de Swartzwelder et collaborateurs en 2012 montrent une absence de perturbation mnésique dans le test de reconnaissance de nouvel objet, 72h après une exposition à l'éthanol 1,5g/kg, i.p., tant chez le rat adolescent (P30) que chez le rat adulte (P70) (Swartzwelder et al. 2012). Toutefois, dans le présent travail de thèse, l'éthanol est administré à deux reprises, à une dose deux fois supérieure (3g/kg) et 48h avant la phase d'apprentissage du test de reconnaissance de nouvel objet et les résultats indiquent des perturbations mnésiques. Relativement aux travaux de Swartzwelder et coll. (2012), l'apparition des perturbations mnésiques dans nos travaux pourrait être inhérente 1) à la dose d'éthanol deux fois plus élevée ou 2) au nombre d'alcoolisations. Dans la littérature, on remarque que très peu d'études ont recherché les effets à distance de d'un faible nombre d'expositions à l'éthanol sur les apprentissages. Toutefois, Wozniak et collaborateurs ont

montré, en 2004, que deux épisodes d'alcoolisation (2,5g/kg s.c., à 2h d'intervalle) à P7 suffisait à altérer les performances mnésiques des souris dans le test de piscine de Morris lorsqu'elles sont âgées de 1 ou 2,5 mois (Wozniak et al. 2004; Wagner et al. 2014). Cependant, ces dernières études démontrent un effet développemental de l'éthanol sur les processus mnésiques. Ainsi, nos travaux font partie des quelques études qui rapportent des effets mnésiques à distance de seulement deux expositions à l'éthanol, et nous sommes les seuls à rapporter des effets d'une double alcoolisation de type *binge drinking* durant l'adolescence.

b) Modulation de la plasticité synaptique dans l'hippocampe par l'éthanol

Nos travaux montrent que les perturbations mnésiques s'accompagnent d'une augmentation de l'amplitude de la PLT somatique et d'une abolition de la DLT somatique et dendritique dans CA1. L'augmentation de l'amplitude de la PLT somatique est quelque peu surprenante notamment lorsqu'elle s'accompagne d'une perturbation mnésique. En effet dans la littérature, les perturbations cognitives s'accompagnent généralement d'une PLT somatique et/ou dendritique absente ou diminuée dans CA1, que ce soit dans le contexte de l'éthanol (Johsen-Soriano et al. 2007 ; Tapia-Rojas et al. 2018), du déclin cognitif associé à l'âge (Etchamendy et al. 2001) ou encore de la sclérose en plaque (Novkovic et al. 2015) alors qu'une amélioration des capacités cognitives est souvent associée à une amplitude de PLT somatique et/ou dendritique augmentée (Liu et al. 2007; Jeon et al. 2008). Toutefois, un petit nombre d'études a révélé des perturbations de la mémoire spatiale et de peur conditionnée liée au contexte, accompagnées d'une augmentation de la PLT dans CA1, suite à des délétions génétiques (D'Hooge et al. 2005; Garcia-Alvarez et al. 2015; Dilekoz et al. 2015) ; des résultats qui questionnent sur l'association entre PLT et mémoire. Considérant nos résultats ainsi que ceux de certaines autres équipes, nous sommes en mesure de poser la question de l'intérêt à porter au rôle de la DLT dans les processus mnésiques, en complément de celui de la PLT.

En effet, il a été démontré qu'une brève exposition à un nouvel environnement facilitait l'induction de la DLT *in vivo* dans l'aire CA1 chez le rat (Manahan-Vaughan and Braunewell 1999) suggérant une association entre DLT et acquisition de la nouveauté et si nous suivons cette idée, l'impossibilité de déclencher une DLT pourrait entrainer une perturbation de l'apprentissage. De plus, Nakao et collaborateurs ont rapporté en 2002 une corrélation entre l'amplitude de la DLT dans le GD de l'hippocampe et la mémoire de travail spatiale puisqu'une lésion bilatérale du fornix chez le rat diminue à la fois l'amplitude de la DLT et l'alternance spontanée (Figure 21) (Nakao et al. 2002).

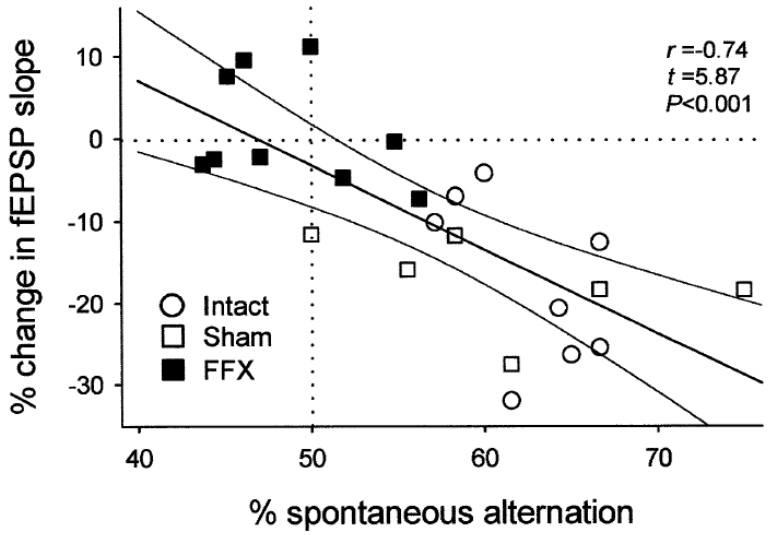


Figure 21 : Corrélation entre performance mnésique dans le labyrinthe en Y et amplitude de DLT dans le gyrus denté. Résultat issu de Nakao et al. 2002

Nous ne sommes donc pas les seuls à rapporter une perturbation de la DLT accompagnée de déficits mnésiques. Cependant dans d'autres études, il s'agit de la mémoire de travail ou de la mémoire spatiale qui sont perturbées en absence de DLT. Ainsi, chez des animaux déficients pour la calcineurine entrainant une absence de DLT dans l'aire CA1, la mémoire de travail est perturbée alors que la mémoire spatiale reste intacte (Zeng et al. 2001). Dans un modèle murin et suite à une délétion génétique, Ohshima et collaborateurs montrent que les animaux présentent des déficits de mémoire spatiale dans le test de piscine de Morris, s'accompagnant d'une abolition de la DLT dans l'aire CA1 alors que, de manière intéressante, la PLT est intacte (Ohshima et al. 2005). A nouveau, l'exposition prénatale à la mélamine

diminue l'amplitude de DLT dans CA1 ainsi que l'apprentissage spatial des animaux (An and Sun 2017). Suivant la même idée, Ge et collaborateurs ont montré *in vivo* qu'un blocage spécifique de la DLT dans CA1 était accompagné d'une perturbation de la mémoire spatiale à long terme, toujours dans un test de piscine de Morris. D'ailleurs et de façon intéressante, dans cette étude, bloquer spécifiquement la PLT n'impacte pas les performances mnésiques des rats (Ge et al. 2010). Ainsi, au regard des résultats décrits ci-dessus et qui démontrent un rôle de la DLT dans certains processus mnésiques (mémoire de travail, mémoire spatiale), nous pourrions supposer que les déficits mnésiques rapportés dans les études montrant une amplitude de PLT augmentée pourraient finalement être la résultante d'une perturbation de la DLT. Malheureusement, dans une grande majorité des cas, la DLT n'est pas mesurée et toutes les interprétations et conclusions reposent sur le seul enregistrement de la PLT.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'effet de l'éthanol sur la plasticité synaptique bidirectionnelle, nos résultats à l'adolescence sont en accord avec les résultats précédemment décrits par le laboratoire dans ce modèle de double intoxication éthylique (Silvestre de Ferron et al. 2015 ; Rabiant et al. 2021 ; Bertrand et al. 2021), révèlant la robustesse de nos observations. Cependant, de manière surprenante, et comme déjà mentionné, nous sommes les premiers et les seuls à rapporter une augmentation de la PLT dans le contexte d'une exposition à l'éthanol alors que la communauté scientifique rapporte communément une diminution/abolition de la PLT, quelle que soit la dose, la durée de l'alcoolisation ou encore la localisation somatique ou dendritique de l'enregistrement (Tremwell et Hunter, 1994 ; Givens et McMahon, 1995 : Roberto et al. 2002 ; Tapia-Rojas et al. 2018). En revanche, concernant la DLT, quelques études ont également rapporté une diminution de l'amplitude de ce signal dans l'aire CA1 mais seulement après une alcoolisation chronique (Thinschmidt et al. 2003 ; Wills et al. 2017) et de façon intéressante, les travaux de Contreras et collaborateurs en 2019 montrent que la DLT est spécifiquement abolie dans CA1 après une période d'alcoolisation intermittente chez le rat adolescent (P33-P57, 18h d'accès à l'éthanol tous les 3 jours pour un total de 8 expositions), alors que l'alcoolisation en continu au cours de cette même période n'impacte pas la DLT (Contreras et al. 2019). Un effet comportemental différentiel de l'exposition intermittente à l'éthanol comparativement à l'exposition continue a également été rapporté à l'âge adulte. En effet chez le rat adulte, l'exposition intermittente à l'alcool entraine une escalade de la consommation volontaire d'éthanol au fil de l'exposition alors que

celle-ci n'est pas observée chez des animaux exposés de façon continue à l'éthanol (Simms et al. 2008). De façon intéressante, Rani et Ticku ont montré en 2006 que traiter des neurones corticaux en culture avec de l'éthanol de façon intermittente (EtOH 75mM 12h/j pendant 5 jours) entrainait une augmentation persistante du niveau d'ARNm de la sous-unité GluN2B après 5 jours de sevrage, un effet qui n'était pas retrouvé lorsque les cellules étaient traitées de façon continue à l'éthanol (Sheela Rani and Ticku 2006). Ainsi, pris dans leur globalité, ces résultats suggèrent que l'alcoolisation intermittente exerce des effets neurobiologiques différents de ceux induits par l'alcoolisation continue et que cette intermittence serait probablement responsable des différences observées au niveau comportemental. Finalement, les résultats de Contreras et coll. (2019) sur la DLT se rapprochent de ceux que nous obtenons suite à deux intoxications éthyliques. Toutefois, dans leurs travaux, ces auteurs confrontent deux caractéristiques de la consommation d'éthanol : la vitesse et l'intermittence. En effet, les animaux dans la condition intermittente ont accès à l'éthanol 20% durant 18h et tous les 3 jours tandis que dans la condition chronique, les animaux ont accès à de l'éthanol 6,7% pendant 18h, chaque jour. Les auteurs rapportent que les animaux consomment des quantités équivalentes d'éthanol (en g/kg/cycle de 3 jours) dans les deux conditions et intuitivement, l'éthanolémie devrait être plus élevée chez les animaux soumis au protocole intermittent puisqu'il s'agit d'un jour de consommation unique. Toutefois, l'éthanolémie n'a pas été mesurée dans ces travaux et nous ne pouvons donc pas affirmer que celle-ci est bien supérieure dans le protocole intermittent. De même, les résultats ne nous permettent pas de déterminer qui, de l'éthanolémie atteinte ou de l'intermittence, est finalement responsable de l'abolition de la DLT. Si nos résultats sur la DLT sont similaires à ceux de Contreras et coll., un autre point commun émerge : celui du délai d'apparition des perturbations qui sont mesurées lorsque l'éthanol n'est plus présent dans l'organisme. En effet, alors que dans cette étude, les effets de l'éthanol intermittent sur la DLT sont mesurés 3,5 semaines après la fin du paradigme d'alcoolisation, nos travaux montrent que les perturbations de plasticité synaptique interviennent dès 48h et sont toujours présentes à 72h. De plus, rappelons que notre première étude (Silvestre de Ferron et al. 2015) ne rapportait aucune modification de la DLT suite à une seule des deux expositions à l'éthanol de notre modèle. Nous pourrions ainsi supposer que durant l'adolescence c'est la répétition des expositions à l'éthanol qui déclenche puis, probablement renforce la persistance des effets sur la DLT. La notion d'âge est également très intéressante dans la mesure où nous avons

montré que les deux épisodes de type *binge drinking* qui entrainent une abolition de la DLT après 48h chez le rat adolescent n'ont aucun effet sur la DLT lorsque les animaux reçoivent le même traitement à l'âge adulte (Sauton et al. 2021) suggérant que l'adolescent est plus vulnérable aux effets de l'éthanol que l'adulte, même si le nombre d'expositions à l'éthanol est faible. Cette différence de sensibilité avait déjà été rapportée chez l'animal par Risher et coll. (2013), dans le contexte des altérations mnésiques suite à 10 intoxications éthyliques (EtOH 5g/kg, i.g.), mais également par Broadwater et collaborateurs, en 2014 vis-à-vis de la neurogénèse suite à 11 expositions à l'éthanol (4g/kg, i.g.).

3- Ethanol, sous-unités NMDA et plasticité dans l'hippocampe

a) Effet de l'éthanol sur la sous-unité GluN2B

Parmi les mécanismes pouvant expliquer la modulation de la plasticité synaptique bidirectionnelle suite à deux épisodes d'intoxication éthylique et dans la mesure où la plasticité synaptique que nous étudions dépend des récepteurs NMDA, nous avons porté un intérêt particulier à ce récepteur et notamment à des modifications possibles de sa composition en sous-unités suite à l'alcoolisation. Nos précédents travaux avaient rapporté une augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B, au moment où la DLT est abolie. Pour aller plus loin et dans la mesure où c'est le ratio de l'expression GluN2A/GluN2B que l'on suppose impliqué dans le phénomène de métaplasticité (Paoletti et al. 2013), nous avons également mesuré dans le présent travail de thèse la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA au NVP AAM077, un antagoniste sélectif de la sous-unité GluN2A. Nos résultats montrent que 48h après le traitement à l'éthanol, le PPSE-NMDA est moins sensible à l'antagoniste GluN2A par rapport aux contrôles, et nous confirmons l'augmentation de la sensibilité en réponse à l'antagoniste GluN2B. Il est important de noter que chez le rat contrôle, nous mesurons une sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA à l'antagoniste GluN2A supérieure à celle de l'antagoniste GluN2B, ce qui est cohérent avec l'évolution développementale de l'expression des sous-unités du récepteur NMDA qui révèle une expression majoritaire de la sous-unité GluN2A à l'âge adulte, alors que

la sous-unité GluN2B est plus exprimée à des âges plus précoces (Akazawa et al. 1994). De façon intéressante, nous avons donc observé que la sensibilité pharmacologique aux antagonistes testés s'inverse 48h après les deux épisodes de type *binge drinking* avec un PPSE-NMDA qui devient plus sensible à l'antagoniste GluN2B comparativement à l'antagoniste GluN2A. Cette inversion de réponse pharmacologique pourrait évoquer un ratio d'expression GluN2A/GluN2B plus fort avant qu'après le traitement à l'alcool, ce qui est souvent assimilé à un stade juvénile dans l'équipement membranaire des synapses glutamatergiques (Gonda 2012). Ces résultats sur la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA conduisent à poser deux hypothèses : 1) les deux épisodes de type *binge drinking* entrainent une modulation des quantités de sous-unités GluN2A et GluN2B dans CA1 après 48h ou 2) l'éthanol induit un mouvement membranaire des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B de la région extra-synaptique vers la région synaptique, comme précédemment montré *in vitro* (Tovar and Westbrook 2002). Pour répondre à cette problématique, nous avons mesuré l'expression protéique des sous-unités GluN2A et GluN2B au niveau neuronal dans l'aire CA1 en utilisant la technique de cytométrie en flux. Les résultats montrent que la quantité de GluN2A est inchangée 48h après l'éthanol tandis que la sous-unité GluN2B est significativement augmentée, suggérant ainsi que la première hypothèse est possible. Cependant, si l'augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA à l'antagoniste GluN2B mesurée en électrophysiologie de champ corrobore l'augmentation de l'expression de GluN2B mesurée en cytométrie en flux, il n'en est pas de même pour GluN2A. La mesure en cytométrie en flux de l'expression de GluN2A ne révélant pas de modification induite par l'alcool, nous nous sommes focalisés sur la sous-unité GluN2B dans nos travaux suivants. Dans la littérature, une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B induite par l'alcool avait déjà été mise en évidence. En effet, à l'aide de culture cellulaire de neurones corticaux, l'exposition à l'éthanol 50mM pendant 5 jours montre une augmentation transitoire du niveau d'ARNm de la sous-unité GluN2B, les niveaux pour les sous-unités GluN1 et GluN2A restant inchangés (Hu et al. 1996). De même, incuber des neurones de l'hippocampe en culture avec de l'éthanol 100mM pendant 5 jours entraine une augmentation des niveaux protéiques de GluN2B, mais à l'inverse de l'étude précédente, une augmentation de GluN2A et de GluN1 est également observée (Maler et al. 2005). Cette divergence d'effet sur les niveaux d'expression génique ou protéique des sous-unités GluN1 et GluN2A pourrait provenir de la dose d'éthanol, deux fois plus élevée dans l'étude de Maler et collaborateurs, et nous pourrions supposer que la sous-

unité GluN2B est la sous-unité du récepteur NMDA la plus sensible à l'éthanol, pour des concentrations modérées. L'effet de l'éthanol sur GluN2B a également été étudié *ex vivo* : au sein du laboratoire, nous avons également mesuré, toujours dans CA1 mais chez la souris adulte, la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA aux antagonistes GluN2A et GluN2B suite à un paradigme de consommation d'éthanol 10% en libre choix durant 4 semaines. Les résultats montrent que la sensibilité du PPSE à l'antagoniste GluN2B est augmentée alors que la sensibilité à l'antagoniste GluN2A est diminuée (Drissi et al. 2021). Il est intéressant de noter que ces résultats sont similaires à ceux que nous obtenons 48h après seulement deux expositions de type *binge drinking* chez le rat adolescent, suggérant que les sous-unités du récepteur NMDA répondent de la même façon à l'éthanol que le traitement soit de courte durée ou bien chronique, que ce soit à l'adolescence ou chez l'adulte. Toutefois, dans un modèle d'alcoolisation en libre choix (EtOH 5,10 ou 20%) d'une durée de 19 mois, le niveau protéique de GluN2B est augmenté dans le cortex frontal des animaux, alors qu'il demeure inchangé dans l'hippocampe ou le noyau accumbens (Henniger et al. 2003) suggérant un effet différentiel en fonction des structures cérébrales ou de la durée d'exposition à l'éthanol. Cependant, Li et collaborateurs ont récemment mis en évidence une augmentation des niveaux d'ARNm et des taux de protéines GluN2B dans l'hippocampe jusqu'à 3 jours après la fin d'un paradigme d'alcoolisation par diète liquide d'une durée de 16 semaines (Li et al. 2019a). Kalluri et collaborateurs ont étudié les effets d'une alcoolisation chronique intermittente chez le rat adulte (EtOH 5g/kg i.g. suivi d'administrations toutes les 8h pendant 6 jours, ajustées en fonction du niveau d'intoxication de l'animal) et montrent une augmentation en Western Blot de GluN1, GluN2A et GluN2B dans le cortex et l'hippocampe 1h après la dernière dose d'éthanol. Cependant, cet effet est transitoire puisqu'il disparaît après 48h (Kalluri et al. 1998). Dans le contexte d'une alcoolisation plus intermittente et dans le noyau accumbens, McGuier et collaborateurs ont rapporté en 2015 suite à des administrations i.p. d'éthanol 3g/kg toutes les 24h pendant 8 jours chez des animaux adultes, une augmentation de GluN2B en Western Blot, 1h après la dernière exposition à l'éthanol (McGuier et al. 2015). Le constat est semblable lorsqu'on s'intéresse aux effets de l'éthanol sur l'expression de GluN2B chez l'adolescent. En effet, Sircar, en 2017, a étudié les effets chez le rat adolescent (P26-P30) d'une administration i.p. d'éthanol 2g/kg pendant 5 jours consécutifs sur l'expression de GluN2B dans l'hippocampe. Les résultats révèlent une augmentation de la phosphorylation de GluN2B 30 minutes et 1h après la dernière exposition

à l'éthanol (Sircar 2017). Un effet similaire a été rapporté dans le striatum dorso-médian 16h après la dernière injection d'une série de 7 administrations d'éthanol 2g/kg i.p. à 24h d'intervalle. D'ailleurs et de façon intéressante, cette même étude montre que l'administration i.c.v. d'ifenprodil, un antagoniste de GluN2B, 15 minutes avant une session d'auto-administration diminue la réinstallation du comportement de recherche d'alcool suite à une période d'extinction (Wang et al. 2010). Finalement dans le contexte d'une exposition aigue à l'éthanol 4g/kg i.p., les niveaux des protéines GluN2A et GluN2B sont augmentés dans l'hippocampe et le cortex, 30 minutes après l'injection, c'est-à-dire à un point proche du pic d'éthanolémie. Cet effet est toutefois très transitoire et revient à la normale dès 6h post-éthanol (Roh et al. 2011). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que la sous-unité GluN2B représente une cible privilégiée de l'éthanol, corroborant ainsi les résultats que nous obtenons suite à deux épisodes de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Toutefois et au regard des études citées, les effets de l'éthanol sur GluN2B semblent relativement transitoires. Nous pouvons ainsi supposer que c'est la répétition rapprochée des deux intoxications éthyliques qui conduit à la surexpression de GluN2B à distance des alcoolisations. Nous pouvons également supposer que la modulation à la hausse de l'expression de GluN2B est également transitoire et bien que nous ne l'ayons pas vérifié, nous devrions mesurer un retour du taux d'expression de GluN2B à un niveau contrôle lorsque les perturbations de plasticité synaptique observées disparaissent, soit à +96h post-*binge*.

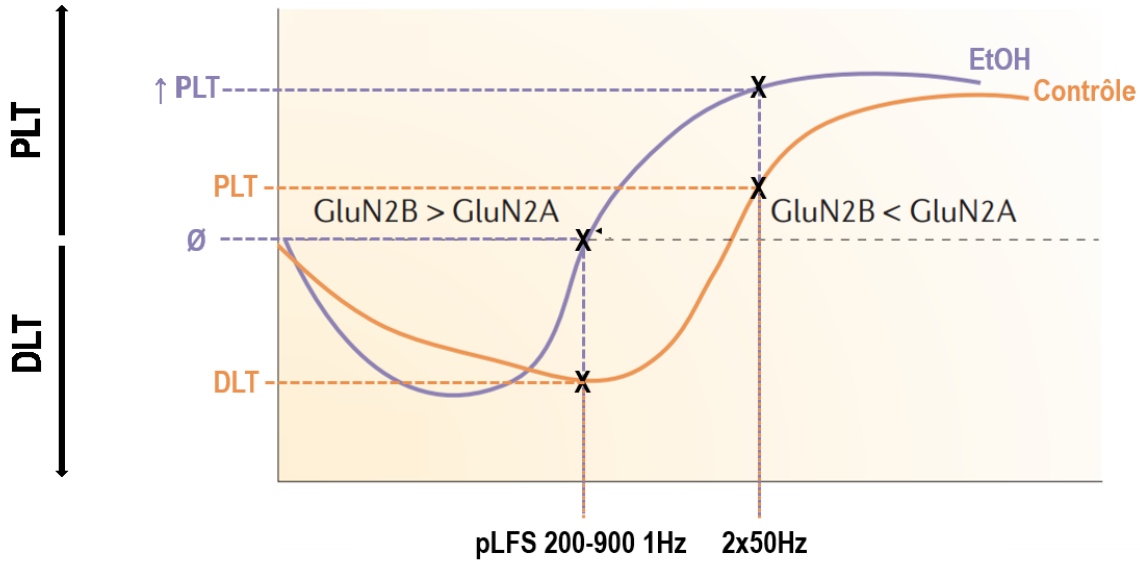
b) Comment la DLT est-elle abolie 48h après deux expositions à l'éthanol ?

Dans un premier temps, nous avons établi des résultats dans le champ somatique puisque l'éthanol a pour cible les récepteurs NMDA et GABA, que l'on retrouve tous deux au niveau somatique, et dans la mesure où la littérature indiquait que les phénomènes de plasticité somatique et dendritique dans CA1 étaient indifféremment abolis par l'éthanol (Roberto et al.

2002). Nos résultats indiquent que les deux intoxications éthyliques induisent une aboliton de la DLT après 48h à la fois dans le champ somatique et dendritique de CA1. Cependant, une limite de nos travaux réside dans le fait que les mesures de PLT ont toutes été réalisées en somatique et que nous n'avons pas d'information sur la PLT dendritique. Néanmoins, au regard de nos résultats sur la DLT et de ceux de Roberto et coll. (2002), il serait étonnant que la PLT dendritique soit diminuée alors que la PLT somatique est augmentée. Des expériences complétementaires sont toutefois à prévoir pour s'assurer de ces derniers propos. Nous nous sommes inspirés des courbes BCM établies dans la région dendritique pour obtenir une idée de ce que pouvait faire l'éthanol sur la notion de seuil θ de déclenchement de la plasticité synaptique, sans oublier toutefois que les mécanismes de la plasticité somatique et dendritique peuvent être différents. En effet, la plasticité dendritique reflète la transmission synaptique alors que la plasticité somatique est souvent liée à des modulations de l'excitabilité neuronale, en plus de la transmission synaptique (Dunwiddie et al. 1978; Heginbotham and Dunwiddie 1991). De fait, nous avons veillé à utiliser la formule rédactionnelle « de type BCM ».

Dans cette approche et à partir des enregistrements de plasticité somatique, les travaux du laboratoire ont montré un déplacement de la courbe de type BCM vers la gauche, 48h après les deux épisodes de *binge* (Silvestre de Ferron et al. 2015). De plus dans ce travail de thèse, nous montrons une augmentation de l'expression de GluN2B dans CA1, alors que l'expression de GluN2A reste inchangée, et nous pouvons donc suggérer que le ratio GluN2A/GluN2B est diminué. Si l'on se réfère à l'adaptation de la courbe BCM au ratio d'expression GluN2A/GluN2B (Paoletti et coll. 2013), le déplacement de la courbe vers la gauche est associé à une diminution du ratio GluN2A/GluN2B. Ainsi, le blocage de la DLT 48h après l'éthanol pourrait s'expliquer par une modification de ce ratio. En effet, comme mentionné dans l'introduction, lorsque le récepteur NMDA contient la sous-unité GluN2B, celui-ci présente un temps d'inactivation plus long que lorsqu'il contient la sous-unité GluN2A (Vicini et al. 1998). Ainsi, l'influx calcique au travers des récepteurs NMDA composés de la sous-unité GluN2B sera plus important que celui des récepteurs composés de la sous-unité GluN2A. Si l'on se réfère aux mécanismes de déclenchement de la plasticité synaptique NMDA-dépendante dans l'aire CA1 de l'hippocampe, on se rend compte que c'est l'influx de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique qui va déterminer la direction que prendra la plasticité

synaptique avec la formation, ou non, du complexe Ca^{2+}/calmoduline. Ainsi, si les deux épisodes d'intoxication éthylique entrainent une augmentation de GluN2B à 48h, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans le champ CA1, l'influx calcique post-synaptique est plus important chez les animaux alcoolisés que chez les animaux contrôles. Ainsi, pour une même fréquence de stimulation des afférences qui conduit à une certaine libération de glutamate, l'influx calcique par les récepteurs NMDA sera plus important chez les animaux alcoolisés et la probabilité de formation du complexe Ca^{2+}/calmoduline sera augmentée, favorisant le déclenchement d'une PLT. Finalement, dans le cadre des résultats obtenus lors de ce travail de thèse nous pourrions proposer le schéma ci-dessous (Figure 22).



<u>Figure 22</u> : BCM de Paoletti et coll. (2013) adaptée par C. Deschamps aux résultats du présent travail de thèse. L'éthanol induit une augmentation de la sous-unité GluN2B entrainant un déplacement de la courbe de type BCM vers la gauche, qui se traduit en une diminution de la probabilité d'induire une DLT, au profit de la PLT.

Dans ce contexte, les travaux de Swartzwelder et collaborateurs en 2017 montrent que les courants NMDA sont augmentés dans CA1 suite à une alcoolisation intermittente à l'adolescence et de façon intéressante, le courant NMDA est inhibé plus fortement par le Ro25-6981 dans la condition éthanol que dans la condition témoin (Swartzwelder et al. 2017),

suggérant une plus grande implication de GluN2B après éthanol, soutenant ainsi l'hypothèse de ce travail de thèse. Cependant, afin de mieux répondre à la question de l'implication de GluN2B dans les effets de l'éthanol, il serait intéressant de mesurer les courants NMDA dans le champ CA1 avec la technique de patch-clamp dans notre modèle de double intoxication éthylique.

Il faut toutefois noter que le lien de causalité entre GluN2B et la plasticité synaptique reste controversé. D'une part, à partir de modèles animaux génétiquement modifiés, Wang et coll. (2009) montrent que chez le rat adulte et suite à une surexpression de la sous-unité GluN2B, la PLT est augmentée dans CA1 alors que l'amplitude de DLT reste inchangée, et ceci est accompagné d'une amélioration mnésique que ce soit dans la mémoire spatiale ou de reconnaissance de nouvel objet (Wang et al. 2009). A l'inverse, chez des animaux ayant subi une délétion post-développementale de GluN2B restreinte à l'hippocampe dorsal et au cortex, la PLT et la DLT sont abolies dans CA1 et ceci est associé à des perturbations mnésiques (Brigman et al. 2010). D'autre part, et si l'on s'intéresse à la manipulation pharmacologique des sous-unités du récepteur NMDA chez des animaux sauvages, l'administration i.p. de Ro25-6981, un antagoniste GluN2B n'impacte pas l'amplitude de la PLT par rapport aux contrôles, alors que la DLT est abolie *in vivo* dans CA1 (Ge et al. 2010). En revanche, ces résultats s'opposent à ceux de Hendriscon et coll. (2002) qui rapportent une augmentation de l'amplitude de la DLT *ex vivo* dans CA1 en présence d'ifenprodil, un antagoniste GluN2B. Ainsi, des études complémentaires semblent nécessaire pour définir dans quelles mesures la surexpression de GluN2B dans notre modèle est capable de moduler à la fois la PLT et la DLT dans CA1.

II- Implication des mécanismes épigénétiques et neuroinflammatoires dans les effets de deux épisodes d'intoxication éthylique à l'adolescence

Nous rapportons des atteintes de mémoire et de plasticité synaptique dans l'hippocampe 48h après deux épisodes de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Ces effets

s'accompagnent d'une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B et de HDAC2 ainsi que d'une diminution du marquage immunohistochimique de la forme acétylée de l'histone 4 (Ac-H4) et de TLR4 dans l'aire CA1 après 48h. De manière intéressante, traiter les animaux au NaB, à la TSA, à la minocycline, à l'indométhacine ou encore au TAK-242 juste avant chaque intoxication éthylique prévient l'ensemble des effets cellulaires et comportementaux de l'éthanol.

1- Implication de mécanismes épigénétiques

a) Effet de l'exposition à l'éthanol sur les processus épigénétiques

L'induction de modulations épigénétiques par l'éthanol a déjà été mise en évidence, et notamment dans l'hippocampe. En effet, une exposition intermittente à l'éthanol (2g/kg, i.p., 2 jours consécutifs suivi de 2 jours de pause et répété pour un total de 8 expositions à l'EtOH) durant l'adolescence augmente l'activité HDAC nucléaire et diminue l'acétylation de H3K9 dans l'hippocampe des rats adultes (Sakharkar et al. 2016). En fait, ces modulations épigénétiques apparaissent dès les premières alcoolisations lorsqu'elles ont lieu très tôt dans le développement puisque Shivakumar et collaborateurs ont rapporté en 2020 chez la souris une augmentation de l'expression de HDAC1, 2 et 3 ainsi qu'une diminution de acH3k14 et acH4K8 dans l'hippocampe suite à seulement deux expositions i.p. à l'EtOH 2.5g/kg, espacées de 2h à P7. D'ailleurs, la même équipe montre que ces effets épigénétiques sont également retrouvés pour une dose moindre d'éthanol (1g/kg). De plus, les animaux qui ont reçu l'éthanol à la dose de 2,5g/kg à P7 présentent des déficits mnésiques à l'âge adulte qui sont prévenus quand une administration de TSA, un inhibiteur HDAC, précède la première alcoolisation (Shivakumar et al. 2020). Ainsi, les résultats des études citées ci-dessus sont cohérents avec ceux que nous obtenons, que ce soit au regard des effets à distance de l'éthanol sur les mécanismes d'acétylation/désacétylation des histones, mais aussi de la prévention par un iHDAC des effets inhibiteurs de l'éthanol sur les performances mnésiques. En revanche, Stragier et collaborateurs ont étudié en 2015 les effets d'une consommation

chronique d'alcool en libre choix d'une durée de 21 jours (éthanolémie maximale 0,5-0,7g/L) chez la souris adulte. Leurs travaux révèlent que *hdac1, 2* et *5* sont significativement diminués dans l'hippocampe, l'acétylation de H4 est augmentée dans le gyrus denté et le niveau d'expression de BDNF est augmenté dans le hile et dans CA3 (Stragier et al. 2015). Ces résultats s'opposent à ceux que nous obtenons puisque nous montrons une augmentation de l'expression de HDAC2 et une diminution de l'acétylation de H4. Toutefois, dans les travaux de Stragier et collaborateurs, les mesures sont réalisées d'une part dans d'autres régions de l'hippocampe que le champ CA1 et d'autre part, immédiatement après la fin d'un protocole d'alcoolisation chronique, c'est-à-dire lorsque l'animal est encore sous les effets pharmacologiques de l'éthanol, à l'inverse de nos travaux où les mesures sont réalisées 48h après les expositions à l'éthanol et avec une éthanolémie qui atteindra 2 g/L. Ainsi, nous pouvons suggérer que les effets immédiats de l'éthanol se traduisent par une diminution des HDAC et une augmentation de l'activité HAT, et que les effets s'inversent probablement à distance de l'alcoolisation. Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec les résultats obtenus dans d'autres régions cérébrales telles que l'amygdale, le cortex préfrontal et le striatum 1h après une exposition aiguë à l'éthanol (Pandey et al. 2008 ; Caputi et al. 2015) (Table 8).

b) Modulations épigénétiques et perturbations mnésiques

L'implication de mécanismes épigénétiques dans la cognition et la prévention des troubles cognitifs par un iHDAC ont été étudiées à plusieurs reprises dans d'autres conditions expérimentales que les expositions à l'éthanol. Fisher et collaborateurs, en 2007, montrent dans un modèle murin inductible de neurodégénérescence que la mémoire spatiale peut être améliorée de deux façons : soit par l'administration de NaB, soit par un enrichissement de l'environnement. De façon intéressante, une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe est retrouvée dans ces deux conditions expérimentales (Fischer et al. 2007). De façon similaire, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'administration de phenylbutyrate (PBA), un iHDAC, prévient les déficits de mémoire spatiale chez la souris (Ricobaraza et al. 2009). Les pathologies neurodégénératives ne sont pas les seules à révéler

des modulations épigénétiques dans les processus de cognition. En effet, chez des animaux adultes naïfs, une administration intra-hippocampique de TSA améliore après 24h les performances mnésiques des souris dans un paradigme de peur conditionnée liée au contexte, ceci étant accompagné d'une augmentation de l'acétylation des histones H3 ainsi que de l'amplitude de la PLT dans CA1 (Vecsey et al. 2007). D'ailleurs, administrer du NaB directement après la phase d'apprentissage d'un test de reconnaissance de nouvel objet permet d'améliorer les capacités mnésiques des animaux lors de la phase de restitution, réalisée 24h plus tard (Stefanko et al. 2009). Dans nos travaux, l'administration de NaB seul n'a pas d'impact sur la mémoire ou la plasticité synaptique. Il est important de noter que dans notre étude, les délais sont plus longs puisque le NaB est administré 48h avant la phase d'apprentissage et les enregistrements électrophysiologiques, c'est-à-dire 96h avant la phase de rétention du test. De plus, la dose de NaB utilisée dans les travaux de Stefanko et collaborateurs (1200mg/kg) est deux fois plus importante que celle que nous avons testé (600 mg/kg). Enfin, l'absence d'effet du NaB sur la mémoire de reconnaissance d'objet que nous rapportons est cohérente avec d'autres travaux récents qui ne rapportent pas d'effet pro-mnésiant du NaB dans le test de la piscine de Morris (Topuz et al. 2020).

c) HDAC2 et mémoire

Si l'on s'intéresse plus précisément aux effets de HDAC2 sur la mémoire, Singh et Takur ont montré en 2018 que la mémoire était perturbée dans le test de reconnaissance de nouvel objet chez des souris âgées (80 ± 2 semaines) par rapport à des souris adultes (30 ± 2 semaines) et que cet effet pouvait être prévenu par le NaB. Comme mentionné précédemment, le NaB est un inhibiteur des HDAC de classe I et IIa, ne permettant pas de cibler spécifiquement une seule famille d'HDAC. De ce fait, Singh et Takur ont utilisé un oligonucléotique anti-sens dirigé contre HDAC2 dont l'administration intra-hippocampique permet, au même titre que le NaB, de prévenir le déclin mnésique lié au vieillissement (Singh and Thakur 2018). Ce résultat suggère un rôle clé de HDAC2 dans les effets de l'âge mais également un lien entre HDAC2 et la mémoire de reconnaissance, corroborant ainsi les résultats que nous obtenons. Lorsqu'on

sort du contexte des maladies neurodégénératives ou du vieillissement, les travaux de Guan et collaborateurs en 2009 ont mis en lumière le rôle prépondérant de HDAC2 dans la cognition : la surexpression génique de HDAC2 chez la souris entraine une altération des processus mnésiques dans deux tâches hippocampo-dépendantes : la tâche de peur apprise liée au contexte et la piscine de Morris, accompagné d'une diminution de l'amplitude de la PLT et d'une réduction des niveaux protéiques de Ac-H4K12, de GluN2A et de GluN2B dans l'hippocampe, alors que le niveau de Ac-H3K14 demeure inchangé. De façon intéressante, ces effets mnésiques ne sont pas retrouvés chez des animaux dont HDAC1 est surexprimée et l'administration de l'iHDAC SAHA pendant les 10 jours précédant les tests mnésiques prévient les perturbations cognitives induites par la surexpression de HDAC2 (Guan et al. 2009). D'ailleurs, dans nos travaux, c'est également l'acétylation de l'histone H4 qui est modulée 48h après l'éthanol alors que l'acétylation de l'histone H3 est inchangée, suggérant un lien étroit entre HDAC2 et l'histone H4. Au regard des perturbations mnésiques associées à une surexpression de HDAC2, nos résultats sont cohérents avec les travaux de Guan et collaborateurs. Toutefois, concernant les sous-unités GluN2A et GluN2B et la PLT, nos résultats vont à l'encontre des résultats de ces auteurs et nous pourrions suggérer que HDAC2 ne se fixe pas au même endroit sur les régions promotrices de GluN2A et GluN2B, entrainant des différences dans l'expression des gènes. De plus, la surexpression de HDAC2 est persistante dans les travaux de Guan et collaborateurs puisqu'il s'agit d'un modèle murin transgénique. Les auteurs montrent également que la surexpression de HDAC2 s'accompagne d'une diminution du nombre d'épines dendritiques dans le champ CA1, un effet cohérent avec la perturbation de la PLT qu'ils rapportent. Toutefois, nous n'avons pas étudié les épines dendritiques et dans la mesure où le remodelage dendritique est un processus très rapide, il serait intéressant de regarder la morphologie des épines dendritiques dans notre modèle. Néanmoins, nos résultats montrent une diminution de la synaptophysine dans le *stratum oriens* de l'aire CA1 48h après les deux intoxications éthyliques, suggérant une perte de synapses. Une augmentation de HDAC2 associée à une perturbation de la mémoire dans un test d'évitement passif et une diminution de l'amplitude de la PLT dans l'aire CA1 a également été rapportée plus récemment dans un modèle de privation de sommeil d'une durée de 5h durant l'adolescence, et ces effets sont prévenus par l'administration de SAHA durant les 7 jours qui précèdent la privation de sommeil. Dans cette étude, la privation de sommeil s'accompagne également d'une diminution de BDNF mesurée en Western Blot et de la

phosphorylation de ERK et de CREB, ce qui est cohérent avec l'abolition de la PLT qui est rapportée (Wong et al. 2020). Finalement, aucune étude n'a rapporté une augmentation de HDAC2 associée à une augmentation de la PLT dans l'aire CA1. Toutefois, Chatterjee et collaborateurs avaient rapporté en 2018 une abolition de la DLT dans cette région accompagnée d'une perturbation de la mémoire spatiale dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, des effets prévenus par un activateur HAT (Chatterjee et al. 2018). Suite à nos travaux, il serait donc intéressant de mesurer les niveaux de gènes impliqués dans la plasticité synaptique tels que ceux codant pour CREB, CAMKII, BDNF, c-Fos ou encore ERK ainsi que le niveau d'enrichissement de HDAC2 sur les promoteurs de ces gènes. De telles expériences pourraient apporter des informations permettant une meilleure compréhension des effets d'une surexpression de HDAC2 sur les modulations de plasticité synaptique induite par les deux épisodes de type *binge drinking* à l'adolescence.

d) Modulation de GluN2B par HDAC2

Dans le chapitre précédent, nous avons discuté l'interaction entre l'augmentation de GluN2B 48h après les deux épisodes de type *binge drinking* et la modulation de plasticité synaptique. Toutefois, si l'association entre augmentation de GluN2B et la modification du seuil θ de déclenchement de la plasticité synaptique semble cohérente si l'on considère l'augmentation de l'influx calcique postsynaptique, l'association n'est pas aussi claire en ce qui concerne HDAC2 et GluN2B. En effet et comme mentionné précédemment, Guan et collaborateurs ont mis en évidence une diminution de GluN2B chez des animaux dont HDAC2 est surexprimée. De plus, ces auteurs montrent que la délétion de HDAC2 entraine une augmentation de GluN2B (Guan et al. 2009). Suivant la même idée, dans un modèle d'épilepsie déclenchée par stimulations électriques, Park et collaborateurs mettent en évidence une augmentation de l'expression de HDAC2 dans le cortex frontal des rats, alors que celles de HDAC1 et 3 restent constantes, et cette augmentation de HDAC2 s'accompagne d'une diminution du taux d'ARNm de GluN2B dans le cortex frontal (Park et al. 2014). De plus, Fujita et collaborateurs ont montré en 2012 que traiter des rats jeunes adultes au SAHA améliorait

la mémoire de peur conditionnée liée au contexte ainsi que les performances dans un test de reconnaissance de nouvel objet, et que ces effets étaient accompagnés d'une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 ainsi que d'une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2B dans l'hippocampe (Fujita et al. 2012). Globalement, ces résultats suggèrent qu'une réduction des HDAC est associée à une augmentation de la sous-unité GluN2B, un effet qui est cohérent avec les principes de base de l'épigénétique qui stipulent qu'une condensation de la chromatine par les HDAC entraine une répression de la transcription des gènes.

Toutefois, certains éléments de la littérature soutiennent nos résultats. En effet, dans une étude sur les effets des prébiotiques, l'administration journalière de triacétate de glycérol (un émulsifiant utilisé dans les chewing-gums) pendant 3 semaines entraine une augmentation des niveaux d'ARNm de HDAC1 et 2 ainsi que de la sous-unité GluN2B à la fois en ARNm et en protéine, dans le cortex des rats (Gronier et al. 2018). De façon similaire, l'auto-administration de méthamphétamine entraine une augmentation de l'expression de GluN2B dans l'hippocampe des rats et de façon intéressante, administrer du MeBib, un inhibiteur de HDAC6, avant chaque session d'auto-administration prévient l'augmentation de GluN2B induite par la méthamphétamine (Kim et al. 2020). Un élément qui pourrait expliquer qu'une augmentation de HDAC2 puisse soit augmenter, soit diminuer l'expression de GluN2B est de considérer la localisation de l'enrichissement de HDAC2 sur le promoteur du gène. En effet, nous pourrions suggérer que si HDAC2 est enrichi au niveau de la région promotrice du gène codant pour GluN2B à un endroit où se fixent des facteurs de transcription positifs (activateurs), la transcription de GluN2B sera réprimée ; si en revanche HDAC2 est enrichi à un endroit où se fixent des facteurs de transcription négatifs (répresseurs), la transcription de GluN2B sera activée. Toutefois, la régulation de l'expression de GluN2B pourrait également être indirecte. Dans ce contexte, une étude sur la privation maternelle chez l'animal a montré que le facteur de transcription REST (*RE1-Silencing Transcription Factor*) était régulé par des mécanismes épigénétiques et que la diminution de REST dans l'hippocampe était associée à une augmentation du taux protéique de GluN2B (Rodenas-Ruano et al. 2012). De plus, dans un modèle de neurones corticaux en culture, le traitement à l'éthanol à 100mM pendant 5 jours, diminue l'expression de REST en ARNm et au niveau protéique, et augmente l'activité de la région promotrice du gène codant pour GluN2B (Qiang et al. 2005). Ainsi, au regard de

ces résultats, une alternative à l'hypothèse d'une régulation directe de GluN2B par HDAC2 dans notre modèle serait que la surexpression de HDAC2 diminue la transcription, et donc *in fine* l'expression de REST, ce qui à son tour augmenterait l'expression des taux de GluN2B dans l'aire CA1. Des expériences supplémentaires sont donc à prévoir afin de mieux comprendre comment l'augmentation de HDAC2 est associée à une augmentation de GluN2B, en s'intéressant par exemple à REST. Dans ce contexte, nous pourrions envisager des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChiP) afin de mesurer le niveau d'enrichissement de REST au niveau des régions promotrices de GluN2B. Finalement, une dernière hypothèse émerge de nos travaux : l'augmentation de HDAC2 que nous mesurons ne relève-t-elle pas du déclenchement de mécanismes compensatoires dans le but de stopper l'augmentation de GluN2B et donc de rétablir son expression à un niveau contrôle ? Suivant cette idée, il faudrait envisager des mesures à différents délais post-éthanol ainsi qu'au-delà des 48h afin de suivre l'évolution de HDAC2 et de GluN2B.

2- La réaction neuroinflammatoire suite à deux expositions à l'éthanol

a) L'éthanol déclenche des processus neuroinflammatoires

Parmi les mécanismes qui pourraient être responsables des effets à distance de l'intoxication éthylique, nous avons émis l'hypothèse que les processus neuroinflammatoires pourraient être impliqués. Dans le contexte de l'alcoolisation chronique chez l'humain, l'équipe de Fulton Crews en analysant des cerveaux post-mortem avait rapporté une corrélation positive entre le niveau d'expression de TLR4 et l'âge auquel la consommation d'éthanol avait débuté (Vetreno et al. 2013). Toutefois, la communauté scientifique a apporté des preuves indiquant que l'implication de mécanismes neuroinflammatoires n'est pas uniquement restreinte à une consommation chronique d'alcool. En effet, chez l'Homme, Gonzalez-Quintela et collaborateurs avaient montré en 2000 que la consommation aiguë de 60g d'éthanol en 1h – ce qui correspond à une API selon la définition de l'OMS - conduisait à une augmentation du niveau d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire, dans le sérum après 36h,

lorsque l'éthanolémie était revenue à zéro (Gonzalez-Quintela et al. 2000). Suivant la même idée, l'équipe de Guerri a décrit une augmentation du niveau des médiateurs pro-inflammtoires (IL-1β, IL-6, CCL2 et TLR4) chez des sujets intoxiqués admis aux urgences et dont l'éthanolémie était comprise entre 2,2 et 2,5 g/L (Pascual et al. 2017). Finalement, de plus amples travaux ont été réalisés chez l'animal dans des contextes d'alcoolisations chroniques ou aiguës et la majorité de ces études rapporte l'induction de marqueurs neuroinflammatoires. Par exemple, la consommation chronique d'éthanol dans l'eau de boisson durant 5 mois conduit à une augmentation corticale de TNF-α, IL-6, IL-1β et COX-2 chez la souris (Alfonso-Loeches et al. 2010) et une augmentation de TNF-α, IL-6, IL-1β est également rapportée entre 3 et 18h après l'administration aiguë d'éthanol (6g/kg i.g. ou 4g/kg i.p.) à l'âge adulte (Walter et Crews, 2017 ; Doremus-Fitzwater et al. 2014). Toutefois, les travaux récents de Van Hees et collaborateurs (2022) ne démontrent pas de modifications des marqueurs inflammatoires tels que l'activation microgliale, TLR4, HMGB1 ou encore IL-1β suite à une consommation d'éthanol à 20% dans l'eau de boisson de P29 à P33 et de P36 à P40, dans le cortex préfrontal des souris, que ce soit 72h après la fin de l'alcoolisation, ou à l'âge adulte (P80) (Van Hees et al. 2022). Dans ce contexte, nous pourrions suggérer que la durée d'exposition ainsi que les niveaux d'éthanolémie atteints sont insuffisants pour déclencher des mécanismes neuroinflammatoires. De même, le constat n'est pas clair en ce qui concerne l'éventuelle vulnérabilité accrue de l'adolescent face aux effets neuroinflammatoires de l'éthanol, et notamment si l'on se réfère à l'étude de Doremus-Fitzwater et collaborateurs qui montre, en 2015, une induction neuroinflammatoire similaire dans l'hippocampe suite à une injection i.p. d'éthanol 4g/kg que ce soit chez l'animal adulte (P67-P69) ou chez l'adolescent (P29-P31). En revanche, une diminution de la neurogénèse et une augmentation de la mort cellulaire dans l'hippocampe chez l'adolescent suite à 11 administrations d'éthanol 4g/kg i.g. effectuées à 48h d'intervalle n'a pas été retrouvé chez les animaux adultes (Broadwater et al. 2014).

Il est finalement délicat de tirer des conclusions face à la diversité des protocoles d'alcoolisation utilisés, de la voie d'administration de l'éthanol, de la structure cérébrale étudiée, ou encore de l'âge des animaux (Figure 15 ; Table 10). D'ailleurs, concernant la voie d'administration, Doremus-Fitzwater et collaborateurs ont mis en lumière des différences notables entre administration i.g. et administration i.p. dans le contexte de la

neuroinflammation. En effet, alors que l'administration d'éthanol 4g/kg par voie i.p. n'impacte pas le niveau d'ARNm de l'IL-6 après 3h dans l'hippocampe, l'administration i.g. de la même dose d'éthanol entraine une augmentation de ces ARNm dans l'hippocampe, après un délai équivalent. Il en va de même pour l'IL-1β qui est diminué suite au gavage alors qu'il est inchangé suite à l'injection i.p. d'éthanol. Ces résultats suggèrent un effet différentiel de la voie d'administration sur les processus neuroinflammatoires et il serait intéressant de savoir si ces différences impliquent un impact des administrations i.g. sur le microbiote gastrointestinal, en comparaison de la voie i.p. Cette suggestion est toutefois à prendre avec précaution car les mesures n'ont été réalisées qu'à un seul temps et nous ne pouvons pas exclure que l'expression des marqueurs neuroinflammatoires soit modulée de la même façon mais à un autre moment dans le contexte de l'administration par voie i.p.. Un autre point qu'il est important de souligner est qu'à doses équivalentes, l'administration d'éthanol par voie i.p. conduit à des éthanolémies qui sont généralement plus élevées que lorsque l'administration est réalisée par voie i.g. (Doremus-Fitzwater et al. 2015) et dont le pic est atteint plus rapidement (Jeanblanc et al., 2019), appelant à nouveau à la vigilance dans la comparaison des résultats obtenus suite aux administrations forcées d'éthanol. En effet, le problème de la voie d'administration dans la discussion des résultats concernant notre étude ne s'était pas posé dans le contexte de l'épigénétique, puisque la grande majorité des études administraient l'éthanol par voie i.p. (Table 8). Il serait donc intéressant de confronter nos résultats à ceux que nous pourrions obtenir en administrant l'éthanol par le biais du gavage, en prenant soin de choisir une dose d'éthanol permettant d'obtenir des éthanolémies équivalentes à celles mesurées dans nos conditions expérimentales. Toutefois, la méthode d'administration par gavage reste délicate dans le contexte d'études concernant des mesures de plasticité synaptique bidirectionnelle, car tout stress imposé à l'animal se répercutera sur ces signaux, notamment dans l'hippocampe, ce qui gênerait grandement nos études (Maggio and Segal 2011; Gonzales et al. 2014).

Dans notre travail, les mesures en RT-qPCR dans des aires CA1 isolées, 48h après les deux épisodes d'alcoolisation ne révèlent pas de modulation des niveaux de TNF-α, IL-1β, IFN-γ ou encore de TGF-β et la double analyse en immunohistochimie et en cytométrie en flux ne révèle pas d'activation microgliale, ce qui suggère l'absence d'un état neuroinflammatoire à ce point de mesure. Nos résultats sont en contradiction avec d'autres études rapportant les effets

d'expositions chroniques à l'éthanol dans la même aire de l'hippocampe (Li et al. 2019b), mais aussi ceux obtenus dans le cortex de souris après seulement 3 intoxications éthyliques (Fernandez-Lizarbe et al. 2009) ou encore après une seule exposition à l'éthanol lorsque les mesures sont effectuées sur le cerveau entier (Walter et Crews, 2017). Un tel constat conduit à deux hypothèses : 1) la neuroinflammation engendrée après seulement deux intoxications éthyliques est transitoire et les mesures sont réalisées trop tardivement, alors que la neuroinflammation est déjà résolue, ou 2) les deux épisodes d'intoxication éthylique n'induisent pas de neuroinflammation. Pour tester la première hypothèse, il faudrait effectuer des mesures des médiateurs inflammatoires à différents temps post-éthanol. Toutefois, et comme abordé précédemment, les travaux qui étudient la neuroinflammation dans le contexte d'expositions à l'éthanol sont très variables tant sur les protocoles d'alcoolisations que sur les points temporels auxquels sont réalisées les mesures, avec parfois des effets opposés. Pour imager ce propos, la Table 14 regroupe plusieurs études qui ont mesuré en RT-qPCR les niveaux de différentes cytokines à différents points temporels, après un seul épisode d'intoxication éthylique à l'âge adulte (Table 14). Ce tableau permet de constater que non seulement, les points temporels diffèrent en fonction de l'étude, mais aussi que dans certains cas, des résultats opposés sont retrouvés à des points temporels similaires. On se rend compte également que seulement deux équipes se sont intéressées à la cinétique d'inflammation suite à une exposition aiguë à l'éthanol ce qui rend difficile de tirer des conclusions précises. Toutefois, nos résultats restent cohérents avec les données présentées dans le tableau ci-dessous, ce qui suggère que l'éthanol module également, et très probablement de façon transitoire les médiateurs de l'inflammation dans notre modèle. D'ailleurs, ce caractère transitoire de la neuroinflammation est cohérent avec la diminution du nombre de neurones matures et l'augmentation du nombre de nouveaux neurones dans la zone sub-granulaire du GD que nous rapportons 48h après les deux intoxications éthyliques, qui suggèrent une neurogénèse compensatoire consécutive d'une souffrance tissulaire.

	3h	6h	9h	12h	15h	18h	24h	Référence
EtOH 6g/kg i.g.		Ø effet		↑IL-4		↑IL-4 ↑CCL2 **↑TNF-α**	↑IL-4	*Walter et Crews, 2017*
EtOH 4g/kg i.p.	**↑IL-6** ↓TNF-α		↑IL-6 ↓TNF-α		↑IL-1β	↑IL-6 **↓TNF-α**		*Doremus-Fitzwater et al., 2014*
EtOH 4g/kg i.p.	↓TNF-α **Ø IL-6**							*Doremus-Fitzwater et al., 2015*
EtOH 4g/kg i.g.	↑IL-6 ↓TNF-α ↓IL-1β							*Doremus-Fitzwater et al., 2014*

Table 14 : La mesure des cytokines inflammatoires à différents points temporels suite à une exposition unique à l'EtOH chez des animaux adultes.

Concernant l'hypothèse selon laquelle les deux épisodes d'intoxication éthylique n'induisent pas de processus neuroinflammatoires, elle semble peu probable dans la mesure où 1) de nombreuses études rapportent cet effet de l'éthanol que ce soit en aigu ou en chronique (Table 10) et 2) l'ensemble des effets que nous rapportons sont prévenus par l'administration d'une substance aux propriétés anti-inflammatoires classiquement utilisée dans notre domaine de recherche : la minocycline. Cependant, dans la mesure où la minocycline est initialement un antibiotique avec divers autres effets (pour revue, Kim and Suh 2009), nous ne pouvions pas nous affranchir d'un éventuel effet de la minocycline qui impliquerait d'autres mécanismes que la neuroinflammation. Pour limiter ces possibilités, nous avons testé l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibiteur non-sélectif des COX, et qui prévient également les effets de l'éthanol sur l'abolition de la DLT 48 après les deux épisodes de type *binge drinking*. De plus, nous avons également testé le TAK-242, un antagoniste de TLR4, un récepteur directement lié à la production de médiateurs inflammatoires par les cellules neurales et nous avons également prévenu les effets de l'éthanol sur la DLT. L'obtention de résultats similaires à l'aide d'outils pharmacologiques de différentes familles chimiques et avec des cibles différentes suggère que l'éthanol agit dans

notre modèle *via* des processus inflammatoires. Concernant TLR4, nos résultats montrent de façon intéressante en immunohistochimie une diminution de son marquage au niveau neuronal dans CA1 48h après les deux épisodes d'intoxication éthylique, un résultat que nous avons confirmé par la technique de cytométrie en flux. Bien que d'autres auteurs aient rapporté que TLR4 était exprimé sur les neurones (Tang et al. 2007), et que l'éthanol modulait l'expression de TLR4 (Fernandez-Lizarbe et al. 2009 ; Vetreno et al. 2013 ; Pascual et al. 2017) il semble que nous soyons les premiers à mettre en évidence un effet de l'éthanol sur le TLR4 neuronal. Finalement, à l'instar des niveaux de cytokines pro-inflammatoires, nous pouvons suggérer que la diminution de TLR4 neuronal est consécutive d'une augmentation qui serait survenue précocement après les administrations d'éthanol. Notre suggestion se base sur le fait que d'une part, cette diminution du TLR4 neuronal est prévenue par la minocycline et que d'autre part, l'administration de TAK-242 avant chaque exposition à l'éthanol prévient l'abolition de la DLT. Dans ce contexte, il serait intéressant de mesurer l'expression de TLR4 à différents points temporels post-éthanol afin de réaliser une cinétique de la modulation de ce marqueur lié à la production de cytokines. En revanche, nous montrons une diminution du nombre de neurones matures dans le GD et l'aire CA3 de l'hippocampe accompagnés d'une astrogliose et d'une augmentation de la neurogénèse dans la zone sub-granulaire du GD, 48h après les deux épisodes d'alcoolisation. De façon intéressante, dans un modèle de neuroinflammation induite par l'injection de LPS, qui diminue la neurogénèse dans l'hippocampe, un traitement au TAK-242 restaure cette neurogénèse (Liang et al. 2019), suggérant que diminuer le rôle de TLR4 après qu'il ait été augmenté suite à un état inflammatoire favorise la neurogénèse. Finalement, on pourrait suggérer que nos résultats reflètent des mécanismes de récupération qui se mettraient en place 48h après les deux épisodes de binge, expliquant ainsi le caractère transitoire des effets que nous rapportons puisque pour rappel, nous montrons que la DLT revient à la normale 96h après les deux épisodes de type *binge drinking*. Dans ce contexte, Nixon et Crews montrent une augmentation de la neurogénèse 14 jours après la fin d'un paradigme d'intoxication éthylique (EtOH 5g/kg puis 3g/kg toutes les 8h pendant 4 jours), démontrant ainsi la mise en place de processus de récupération post-éthanol (Nixon et Crews, 2004).

b) Implication de la neuroinflammation dans les perturbations cognitives induites par l'éthanol

Bien que nous n'ayons pas démontré la présence d'un état inflammatoire 48h après les deux épisodes de type *binge drinking*, nos résultats indiquent que l'administration de substances anti-inflammatoires 30 minutes avant chaque épisode d'alcoolisation permet de prévenir les effets délétères de l'éthanol sur l'apprentissage et les processus cellulaires de la mémoire hippocampo-dépendante. Or, nous savons qu'augmenter le niveau cérébral de TNF-α perturbe l'apprentissage et la mémorisation dans la tâche de Piscine de Morris (Bjugstad et al. 1998) et que l'élévation du niveau d'IL-6 dans l'hippocampe perturbe la mémoire dans un test d'évitement passif (Ma et Zhu, 2000). De même, alors que l'administration i.h. d'IL-1β perturbe la mémorisation dans un paradigme de peur conditionée liée au contexte, l'administration d'un inhibiteur des COX prévient cet effet, amenant une piste intéressante qui suggère que l'IL-1β exerce ses effets en activant COX-2 qui à son tour induit la synthèse de PEG_2 dont l'élévation du niveau perturbe la mémoire (Hein et al. 2007). Finalement, l'administration périphérique de LPS entraine une élévation des médiateurs de l'inflammation dans le SNC et perturbe la mémoire spatiale des animaux. Dans ce contexte, inhiber spécifiquement TLR4 avant l'administration de LPS prévient l'ensemble des effets du LPS (Zhao et al. 2019). Suivant la même idée mais cette fois en curatif, à la suite d'une ischémie cérébrale qui induit des perturbations cognitives accompagnées d'une activation microgliale et d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe, l'administration de minocycline durant les 7 jours corrige ces effets (Naderi et al. 2017). Si la neuroinflammation perturbe la mémoire hippocampo-dépendante, c'est très probablement parce qu'elle influence les mécanismes de plasticité synaptique. Ainsi, chez un animal sain lorsqu'on inhibe COX-2 par l'administration i.p. de celecoxib, l'induction de la PLT est bloquée *in vivo* dans le GD par le biais d'une modulation des acteurs de la plasticité synaptique tels que ERK et c-Fos, et rétablir un niveau physiologique par l'administration i.h. de son métabolite principal, PEG_2 corrige ces effets (Cowley et al. 2008). De manière similaire, l'application d'IL-1β sur la tranche augmente l'amplitude de la PLT dans le champ CA1 et abolie la DLT mimant ainsi certains des effets de la sclérose en plaque (Nisticò et al. 2013). Nous avons vérifié cet effet inhibiteur de l'IL-1β sur la DLT et nous montrons effectivement une abolition de la DLT lorsqu'elle est

déclenchée en présence d'IL-1β et seulement en sa présence puisqu'après rinçage de l'IL-1β, la DLT pouvait à nouveau être déclenchée. Ce résultat laisse penser que l'abolition de la DLT 48h après les alcoolisations dans notre modèle pouvait être due à un taux circulant important d'IL-1β, un marqueur d'un état inflammatoire. Toutefois, dans la mesure où nous ne rapportons pas d'élévation du niveau d'IL-1β dans l'hippocampe après 48h, ni changements morphologiques de la microglie, il est peu probable que l'abolition de la DLT induite par l'éthanol soit directement causée par la présence d'une neuroinflammation. Dans ce contexte, nous pourrions suggérer que l'éthanol agit par des processus neuroinflammatoires précoces et transitoires, suffisant pour moduler à plus long terme les processus mnésiques en en altérant les mécanismes de la plasticité synaptique. Dans ce contexte, l'augmentation de la sensibilité pharmacologique du PPSE-NMDA à l'antagoniste de la sous-unité GluN2B induite par l'éthanol après 48h n'est pas retrouvée chez les animaux qui ont reçu la minocycline, soutenant ainsi notre suggestion. Les travaux de Pascual et collaborateurs en 2007 montrent une perturbation mnésique dans le test de reconnaissance de nouvel objet 24h après la fin d'un paradigme d'alcoolisation long et intermittent (8 injections) à l'adolescence, une perturbation qui est associée à une élévation des médiateurs de l'inflammation dans l'hippocampe. Ils montrent également que cet effet est persistant puisque la mémoire est toujours perturbée à l'âge adulte. En revanche, les médiateurs de l'inflammation n'ont pas été mesurés dans l'hippocampe et de fait, nous ne savons pas si les perturbations mnésiques qui persistent à l'âge adulte sont toujours associées à une élévation des médiateurs de l'inflammation ou s'il s'agit d'une modulation à long terme des processus cellulaires de la mémoire qui aurait été initiée par la neuroinflammation à l'adolescence. Toutefois, dans la mesure où les travaux de Zhao et collaborateurs en 2013 sur les effets d'une l'alcoolisation intermittente (EtOH 5g/kg i.g. puis 3g/kg toutes les 8h pendant 4 jours suivi de 3 jours d'abstinence, le tout étant répété 4 fois) montrent que l'augmentation de la mort neuronale et la diminution de la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe sont revenues à la normale en 14 jours et que l'activation microgliale ne persiste pas au-delà d'1h, nous pouvons effectivement supposer que les effets à long terme de l'intoxication à l'éthanol sur la mémoire rapportés par Pascual et coll. (2007) ne sont pas dus à une neuroinflammation résiduelle.

c) Influence de la neuroinflammation sur l'expression de GluN2B

Finalement, nos deux hypothèses de travail convergent vers une adaptation finale de l'expression des sous-unités du récepteur NMDA et notamment GluN2B. De façon intéressante, en 2011, Caracciolo et collaborateurs rapportent une diminution des niveaux d'ARNm des sous-unités du récepteur NMDA dans l'hippocampe de souris qui n'expriment pas *cox-2* (Caracciolo et al. 2011). De plus, suite à une alcoolisation durant la gestation (EtOH 12,5% de 6 à 21 jours de gestation), la descendance présente une diminution de la neurogénèse ainsi qu'une activation astrocytaire et microgliale dans l'hippocampe à J21, un niveau d'ARNm de GluN2B augmenté alors que celui de GluA2, une sous-unité des récepteurs AMPA, est diminué (Takahashi et al. 2021). La littérature rapporte également dans un modèle d'épilepsie qui induit une activation microgliale dans CA1, que bloquer pharmacologiquement la sous-unité GluN2B contrecarre cette activation (Loss et al. 2019) suggérant une implication de la sous-unité GluN2B dans les effets d'une neuroinflammation. D'ailleurs, suite à une injection de LPS, l'expression totale de GluN2B ainsi que sa phosphorylation sont significativement augmentées dans CA1 après 24h (Tang et al. 2020). Finalement, dans un modèle animal de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, dans laquelle l'IL-1β est augmenté dans les astrocytes de l'hippocampe, la phosphorylation de GluN2B augmente ainsi que l'amplitude de la PLT dans CA1 et l'application *ex vivo* d'IL-1ra corrige cette augmentation (Bertani et al. 2017). Pour conclure, la littérature démontre que l'engagement de la neuroinflammation pouvait être associé à une modulation de GluN2B, soutenant ainsi notre hypothèse d'une augmentation de GluN2B induite par la neuroinflammation et responsable des atteintes de mémoire et de plasticité synaptique 48h après les deux épisodes de type *binge drinking*.

3- Quel serait le lien entre neuroinflammation et épigénétique ?

Nos résultats suggèrent que l'éthanol est responsable de modifications d'ordre épigénétique ainsi que d'un état neuroinflammatoire précoce et transitoire chez le rat adolescent et que ces effets peuvent être prévenus, soit en modulant l'état de compaction de la chromatine par des inhibiteurs HDAC, ou bien en contrecarrant l'augmentation des médiateurs de l'inflammation à trois niveaux différents : les cytokines avec la minocycline, les prostaglandines avec l'indométhacine ou bien le récepteur TLR4 avec le TAK-242. Ainsi se pose naturellement la question d'un lien entre les processus épigénétiques et neuroinflammatoires qui pourrait expliquer pourquoi bloquer l'induction de l'un ou de l'autre de ces mécanismes permet de prévenir de manière similaire les effets de l'éthanol dans l'hippocampe et sur le plan mnésique.

En règle générale, la littérature place les modifications épigénétiques avant le déclenchement d'une neuroinflammation, dans la mesure où les acteurs épigénétiques modulent l'accès de la chromatine aux facteurs de transcription des gènes, ici liés à l'inflammation. En effet, l'exposition au LPS de cellules gliales en culture entraine une augmentation des niveaux de COX-2, iNOS, TNF-α et IL-1β en Western Blot et traiter les cellules avec l'iHDAC SAHA prévient ces forts niveaux d'expression (Faraco et al. 2009), suggérant que l'activité HDAC est essentielle pour l'expression de médiateurs pro-inflammatoires. Dans ce contexte, la littérature confère des effets anti-inflammatoires aux iHDACs. On citera notamment une étude dans laquelle une injection de LPS chez la souris augmente HDAC2, HDAC5, TNF-α et IL-1β dans l'hippocampe et l'administration de TSA prévient ces effets (Hsing et al. 2015).

Toutefois, la séquence d'évènements inverse a été suggérée dans les travaux de l'équipe de C. Guerri que nous avons déjà évoqués. Suite à un protocole d'alcoolisation de 5 mois via l'eau de boisson, le niveau d'acétylation de l'histone H4 est diminué dans l'hippocampe et il y a une activation microgliale et astrocytaire dans le cortex frontal accompagnés de déficits mnésiques dans le test de reconnaissance de nouvel objet. Ces effets ne sont pas retrouvés chez des souris dont le gène codant pour TLR4 a été délété (Pascual et al. 2011). Un résultat similaire a été retrouvé dans un contexte d'exposition de type *binge*

drinking intermittent au cours duquel les animaux reçoivent une injection d'éthanol 3g/kg i.p. deux jours consécutifs suivi de deux jours sans EtOH, pour un total de 8 intoxications éthyliques, pendant la période précoce de l'adolescence. Ici, les animaux présentent une activation microgliale ainsi qu'une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 sur plusieurs lysines dans le cortex préfrontal et ces effets ne sont pas retrouvés quand les animaux présentent une délétion de TLR4 (Montesinos et al. 2016). Ainsi, ces résultats suggèrent un lien entre TLR4 et changements épigénétiques. Dans ce contexte, nous pourrions envisager que dans notre modèle de double intoxication éthylique, l'induction de mécanismes neuroinflammatoires précoces (pendant ou peu après les administrations d'éthanol) et transitoires entraineraient la surexpression de HDAC2, qui à son tour modulerait l'expression de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA pour entrainer *in fine* les perturbations mnésiques par l'action de GluN2B sur la plasticité synaptique bidirectionnelle dans l'hippocampe. Cette succession d'évènements serait cohérente avec l'absence de neuroinflammation et l'augmentation de HDAC2 que nous rapportons à 48h dans CA1. Dans ce cadre, la séquence proposée ci-dessus devrait inclure une interaction directe de l'éthanol avec les récepteurs TLR4, ce qui a déjà été suggéré par Blanco et collaborateurs, en 2005.

Pour démontrer lequel des deux enchaînements d'évènements cellulaires proposés ici intervient dans notre modèle, il faudrait déterminer la cinétique d'apparition des acteurs de la neuroinflammation ainsi que de HDAC2 dès le premier épisode d'intoxication éthylique et jusqu'à 48h après le second, dans le but de déterminer lequel de ces deux processus intervient le premier. Également, si la présence d'une neuroinflammation précoce est confirmée, nous pourrions envisager de bloquer spécifiquement HDAC2 avec un siRNA dirigé contre HDAC2 administré directement dans l'hippocampe et mesurer les marqueurs neuroinflammatoires. Si les mêmes modulations des marqueurs neuroinflammatoires sont retrouvés dans la condition EtOH et dans la condition EtOH+siRNA, alors nous pourrions déduire que les effets de la neuroinflammation sur les processus mnésiques sont relayés par des modulations épigénétiques.

III- Nos résultats dans la problématique des troubles de l'usage de l'alcool

Les résultats obtenus qui concernent l'implication de mécanismes épigénétiques et neuroinflammatoires dans les perturbations cognitives au sein de l'hippocampe suite à seulement deux intoxications éthyliques à l'adolescence peuvent être replacés dans le contexte plus général des troubles de l'usage d'alcool (TUA) et ce, d'autant plus que la pratique du *binge drinking* à l'adolescence serait un facteur de vulnérabilité au développement d'un TUA, comme suggéré dans les études cliniques (Townshend and Duka 2002; Kuntsche et al. 2017). Dans ce contexte, en préclinique, les travaux de notre laboratoire montrent que l'alcoolisation intermittente à l'adolescence chez le rat (P30-P43) conduit à une augmentation de la consommation volontaire d'éthanol à l'âge adulte, ainsi qu'à une motivation accrue à consommer de l'éthanol (Alaux-Cantin et al. 2013).

Le circuit de la récompense - dont fait partie l'hippocampe - est largement impliqué dans les processus d'addiction. Un intérêt particulier est porté aux rôles du noyau accumbens et de l'aire tegmentale ventrale (ATV), deux structures cérébrales largement impliquées dans la récompense et le renforcement, et en conséquence dans les comportements dirigés vers un but. Différents iHDAC ont montré des effets prometteurs dans le traitement des aspects physiques et motivationnels liés à l'usage d'alcool. Par exemple, l'acide valproïque (VPA), un iHDAC, diminue la motivation à consommer de l'éthanol et la préférence dans un paradigme de consommation d'éthanol en libre choix chez le rat et bloque également l'acquisition d'une préférence de place conditionnée induite par l'éthanol. De plus, le VPA diminue l'activité HDAC globale dans le noyau accumbens (Al Ameri et al. 2014). Dans notre laboratoire, des études menées chez des rats alcoolodépendants montrent que l'administration de NaB ou de MS-275 diminue la consommation volontaire d'éthanol et prévient la rechute (Simon-O'Brien et al. 2015). Notre équipe a montré des effets similaires du MS-275 dans un modèle de consommation volontaire d'éthanol chez le rat non-dépendant. Plus encore, l'administration i.c.v. de MS-275 augmente l'acétylation de H4K12 dans le noyau accumbens et le striatum dorsolatéral de manière dose-dépendante (Jeanblanc et al. 2015). Finalement, dans le cadre d'un paradigme de consommation intermittente d'éthanol chez le rat adulte (24h d'accès à

l'EtOH suivi de 24h d'accès à l'eau, répété 17 fois), les niveaux de *hdac2*, *hdac3* et la sous-unité α1 du récepteur $GABA_A$ sont augmentés dans le cortex préfrontal des animaux, qui présentent une hyperanxiété. De façon intéressante, la TSA administrée en fin de paradigme (session 14) corrige ces effets et diminue la consommation volontaire d'éthanol lors des sessions suivantes (Bohnsack et al. 2018). L'ensemble de ces travaux suggère donc une implication de la balance acétylation/désacétylation dans les aspects motivationnels liés à l'éthanol. Outre les effets épigénétiques, l'implication de processus neuroinflammatoires a également été rapportée dans ce contexte. Ainsi, des souris soumises à une exposition intermittente à l'éthanol durant l'adolescence développent une préférence accrue pour l'éthanol ainsi qu'une préférence de place conditionnée suite à l'administration de cocaïne et la délétion du gène codant pour le récepteur TLR4 protège de ces effets (Montesinos et al. 2016). De même, la consommation d'éthanol en libre choix diminue chez des souris dépendantes et non-dépendantes après l'administration d'un antagoniste sélectif du récepteur TLR4 (Bajo et al. 2016) ou suite à une exposition intermittente à l'éthanol à l'adolescence en prévenant la neuroinflammation par le nalméfène (Montesinos et al. 2017). Finalement, la minocycline diminue la consommation volontaire d'éthanol (Agrawal et al. 2011) tout comme l'administration d'IL-1ra administré dans l'amygdale (Marshall et al. 2016). Dans ce contexte, chez des souris dépendantes qui présentent une escalade de la consommation dans le paradigme de consommation d'éthanol en libre choix, une prolifération microgliale est observée dans le cortex préfrontal médian des souris ainsi qu'une augmentation des transmissions glutamatergiques et GABAergiques et une régulation génique notamment des sous-unités des récepteurs AMPA et GABA. De façon intéressante, réduire le nombre de cellules microgliales avant l'exposition à l'éthanol prévient ces effets chez les souris dépendantes sans pour autant modifier les niveaux de consommation des souris non-dépendantes, suggérant que la microglie joue un rôle majeur dans la transition d'une consommation volontaire contrôlée vers la dépendance (Warden et al. 2020).

Ainsi et au regard de nos travaux, l'ensemble de ces études indique que les processus épigénétiques et neuroinflammatoires constituent un dénominateur commun dans les atteintes cognitives et comportementales induites par l'éthanol, dans différentes structures cérébrales. Bien que les études précédemment décrites rapportent des effets après une exposition longue à l'éthanol et dans la mesure où nos résultats montrent l'implication de ces processus dès les deux premières expositions à l'éthanol de type *binge drinking*, nous

pourrions suggérer que ces processus sont engagés dès les premières expositions à l'éthanol. Toutefois, la question reste de savoir comment est modulée la plasticité synaptique dans les structures cérébrales qui sous-tendent les comportements décrits ci-dessus. De façon intéressante, une exposition chronique intermittente à l'éthanol (16h/jour, 4 jours) conduit à une abolition de la DLT dans le noyau accumbens, 25h après la fin de l'exposition. De plus, la fonctionnalité du récepteur NMDA est augmentée (Renteria et al. 2017).

Finalement, l'acteur mis en évidence dans nos travaux et qui semble responsable des effets du double *binge* sur les processus cognitifs, la sous-unité GluN2B, a également été mis en évidence dans le noyau accumbens. En effet, chez des souris jeunes adultes ayant développé une sensibilisation aux effets hyperlocomoteurs de l'éthanol (1,8g/kg i.p., pendant 21 jours) et qui présentent une augmentation de la consommation volontaire d'éthanol dans un paradigme de *drinking in the dark*, la DLT est diminuée dans le noyau accumbens et l'expression de GluN2B est augmentée (Abrahao et al. 2013). Dans un contexte similaire, nous avions montré au sein du laboratoire que la sensiblisation aux effets hyperlocomoteurs de l'éthanol (1g/kg, i.p., 14 jours) altérait l'expression de nombreux gènes liés aux mécanismes épigénétiques dans le striatum et que l'administration de NaB était capable de prévenir ou de contrer cette sensibilisation comportementale (Legastelois et al. 2013).

Enfin, manipuler la plasticité synaptique *in vivo* dans le noyau accumbens module le comportement de rechute. En effet, induire de la DLT par optogénétique au niveau des afférences issues de l'hippocampe ventral, abolie la préférence pour le levier associé à la cocaïne (Pascoli et al. 2014), suggérant un lien de causalité entre plasticité synaptique dans le noyau accumbens et conséquence comportementale. D'ailleurs, cette association est renforcée par les travaux de Kasanetz et collaborateurs, en 2010, qui montrent une abolition de la DLT dans le noyau accumbens chez des rats dépendants à la cocaïne, ainsi qu'une corrélation positive entre faible amplitude DLT et score d'addiction (Kasanetz et al. 2010).

L'effet d'un faible nombre d'épisodes de type *binge drinking* n'a toutefois pas été étudié sur la plasticité synaptique dans le noyau accumbens, bien que le renforcement/affaiblissement des réseaux de neurones au sein de cette structure puisse apporter des informations intéressantes dans la génèse des altérations comportementales voire la vulnérabilité à l'addiction**.** D'ailleurs, l'hippocampe représentant une afférence importante du noyau accumbens, nous pouvons imaginer qu'une modulation de la plasticité

synaptique dans l'hippocampe, comme nous le rapportons suite à deux intoxications éthyliques, pourrait avoir des répercussions sur la transmission synaptique dans le noyau accumbens, et *in fine* les comportements dirigés vers un but.

IV- Perspectives

Ce travail de thèse suggère que dès les expositions initiales à l'éthanol pendant la période adolescente, il y a mise en jeu de processus neuroinflammatoires et épigénétiques responsables d'atteintes mnésiques pendant plusieurs jours, ce qui n'est pas anodin considérant les chiffres relatifs à la consommation d'alcool chez les jeunes. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus donne lieu à de nouvelles et nombreuses questions scientifiques qui pourraient initier de futurs projets de recherche à court et à long terme. Nous en suggérons ici quelques unes.

1- Confirmer l'implication de GluN2B dans les effets des deux intoxications éthyliques sur la mémoire

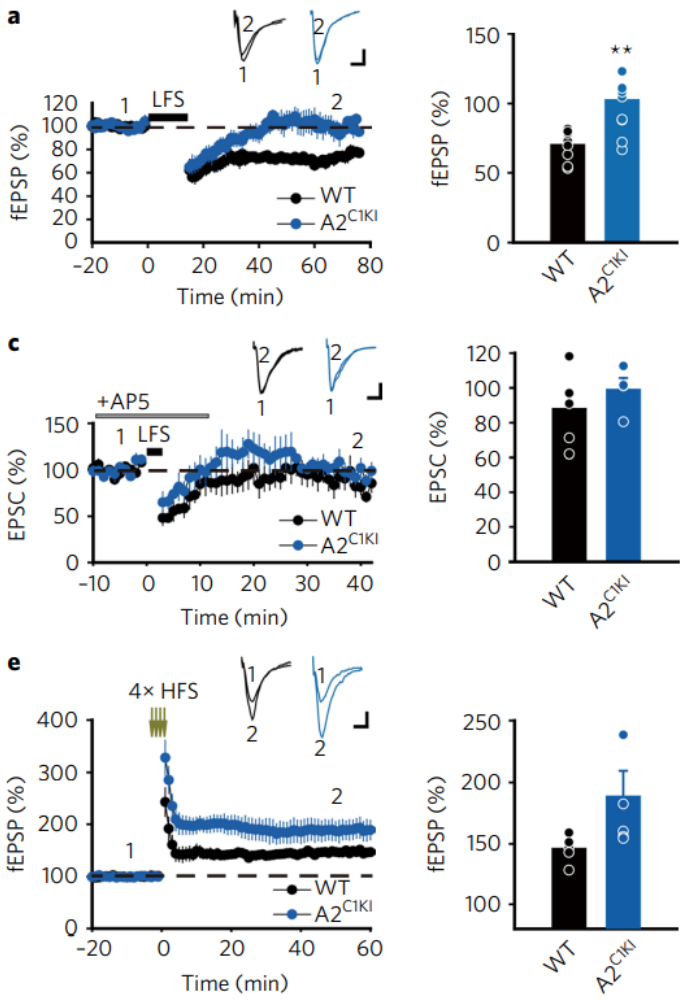
Parmi les questions qui ont été soulevées dans cette discussion, l'une d'entre elles concernait le rôle de GluN2B dans les altérations de plasticité synaptique que nous rapportons et qui serait à l'origine des déficits mnésiques. Cependant, nous ne démontrons pas que c'est bien l'augmentation de GluN2B 48h après l'éthanol qui perturbe effectivement la plasticité synaptique et l'apprentissage. A ce titre, ce lien de causalité pourrait être démontré de deux façons : 1) **48h après les deux intoxications éthyliques, en incubant les tranches d'hippocampe avec un antagoniste GluN2B avant déclenchement de la plasticité synaptique.** Ainsi, dans ces conditions, récupérer une PLT et une DLT similaires à celles des animaux contrôles indiquerait que les perturbations de la plasticité bidriectionnelle implique

bien la sous-unité GluN2B. Nous avons commencé cette démonstration et nos résultats préliminaires encourageants (Annexe 1) révèlent que bloquer *ex vivo* la sous-unité GluN2B après les alcoolisations corrige l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la DLT ; 2) **en contrecarrant l'augmentation de l'expression et du rôle de GluN2B *in vivo* par l'administration i.p. de Ro25-6981 avant la phase d'apprentissage du test de reconnaissance de nouvel objet,** afin de récupérer les capacités d'apprentissage des animaux contrôles lors de la phase de rétention. Que ce soit dans l'étude *ex vivo* ou dans l'étude *in vivo* et en considérant la littérature, le choix de la dose d'antagoniste GluN2B administrée est crucial dans la mesure où chez l'animal sain, diminuer le niveau physiologique de GluN2B perturbe à la fois la plasticité synaptique dans l'hippocampe et la mémoire (Fox et al. 2006; Ge et al. 2010). Dans ce cadre, j'ai déjà effectué une étude pilote *in vivo* qui as permis de déterminer la dose de Ro25-6981 qui diminue les effets de GluN2B après les alcoolisations sans toutefois avoir d'effets dans le groupe contrôle. Aujourd'hui il nous reste à tester cette dose dans un protocole expériemental d'apprentissage complet. Bien que le but majeur de ce travail de thèse fût de déterminer les mécanismes qui relayent les effets délétères de seulement deux épisodes de type *binge drinking* chez le rat adolescent, mettre en évidence un effet curatif de la modulation de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA dans la récupération des performances cognitives dans ce contexte de *binge drinking* pourrait apporter des pistes thérapeutiques intéressantes dans la prise en charge des déficits cognitifs chez les *binge drinkers.* Dans ce cadre, un antagoniste de GluN2B, le MK-0657 (ou Traxoprodil) a fait l'objet d'une étude pilote menée chez des patients atteints de dépression résistants au traitement et a montré des effets anti-dépresseurs intéressants, ainsi qu'une bonne tolérance (Ibrahim et al. 2012).

2- Vers l'hypothèse d'une implication de GluA2 dans les effets de quelques *binges* ?

Si le lien entre surexpression de GluN2B et abolition de la DLT dans CA1 – abordé dans la première partie de la discussion - peut être remis en question par le manque de littérature à

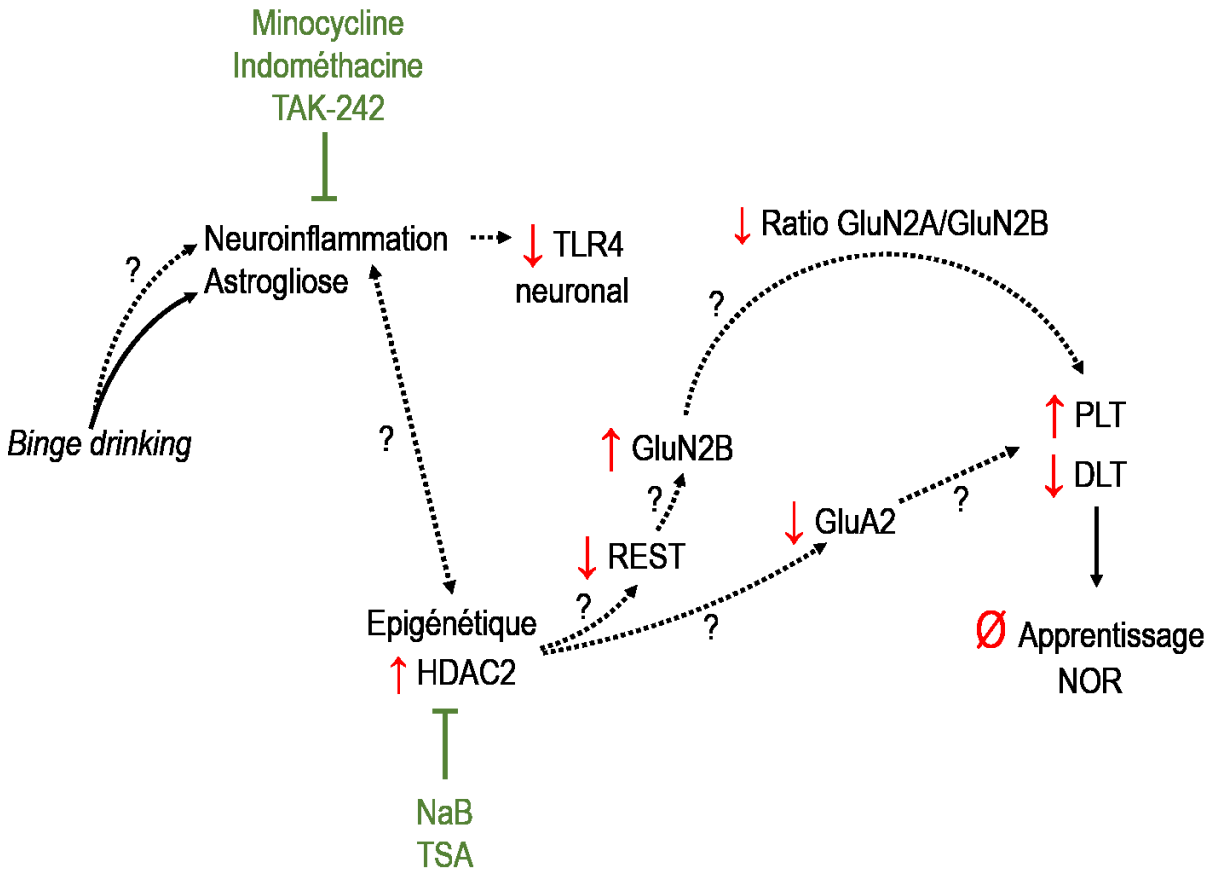
ce sujet, **une limite de nos travaux est de ne pas s'être plus amplement intéressé aux autres récepteurs du glutamate, notamment les récepteurs AMPA, qui pourraient également participer aux modulations de plasticité synaptique induites par les deux épisodes de type *binge drinking*.** En effet, suite à une seule administration i.p. d'EtOH à dose modérée (1g/kg) entre P28 et P42, une diminution de l'expression de la sous-unité GluA2 du récepteur AMPA dans l'hippocampe des animaux après 24h a été rapportée (Santerre et al. 2014). De plus, une étude récente montre que l'exposition de tranches d'hippocampe en culture issues de rats juvéniles à 150mM d'EtOH durant 7 jours entraine une diminution du taux d'ARNm de GluA2, 24h après la fin de l'alcoolisation, et du niveau d'expression de GluA2 au niveau de la densité post-synaptique dans le champ CA1 (Gerace et al. 2021). Comme mentionné dans l'introduction, la sous-unité GluA2 du récepteur AMPA joue un rôle crucial dans la perméabilité du récepteur puisque son absence rend le récepteur perméable au Ca^{2+}. Nous pouvons donc poser la question de l'impact d'une modulation de la composition en sous-unités du récepteur AMPA sur la plasticité synaptique dans CA1 dans notre modèle expérimental. De façon intéressante, la délétion de l'extrémité C-terminale de la sous-unité GluA2 entraine une augmentation de l'amplitude de la PLT ainsi qu'une abolition de la DLT NMDA-dépendante dans l'aire CA1. De plus, alors que la mémoire spatiale dans la piscine de Morris est inchangée, les souris qui présentent la délétion ont des capacités mnésiques altérées dans une tâche de peur apprise liée au contexte (Zhou et al. 2018) (Figure 23). Ainsi, ces résultats indiquant une augmentation de la PLT et une absence de DLT dans CA1 dans le contexte d'une absence de GluA2 corroborent les effets des deux épisodes de type *binge drinking* sur la plasticité synaptique bidirectionnelle que nous décrivons. Par contre et de manière intéressante il sera nécessaire de mesurer si les capacités d'apprentissage de la nouveauté sont réduites car il semble d'après cette littérature que le rôle de GluA2 soit lié préférentiellement à un apprentissage de type contextuel.



<u>Figure 23</u> : La sous-unité GluA2 module l'amplitude de la plasticité synaptique NMDA-dépendante dans CA1. Résultats issus de Zhou et al. 2018

Egalement, dans une étude concernant le canal ionique TRPV1, un canal présent sur les neurones sensoriels dont l'activation semble impliquée dans certaines neuropathies, son activation entraine une augmentation de HDAC2 dans l'hippocampe accompagnée d'un enrichissement de HDAC2 au niveau du promoteur du gène codant pour GluA2, associé à une diminution de l'expression protéique de GluA2 (Wang et al., 2018 PMID 29520110). Ainsi, l'hypothèse d'une diminution de GluA2 48h après les deux épisodes de type *binge drinking* serait cohérente avec l'augmentation de HDAC2 que nous rapportons. La cible de HDAC2 dans notre contexte pourrait donc concerner la sous-unité GluA2 et pas seulement la sous-unité GluN2B. Au regard de toutes ces données, il serait intéressant de cibler GluA2 en mesurant son expression au niveau neuronal dans CA1 48h après les deux épisodes d'intoxication

éthylique par la technique de cytométrie en flux qui permet un tri cellulaire afin de voir si l'augmentation de GluN2B sur les neurones de CA1 que nous avons mis en évidence s'accompagne d'une diminution de GluA2, ce qui pourrait également expliquer les perturbations de plasticité synaptique bidirectionnelle que nous rapportons. Si une diminution de GluA2 induite par l'éthanol venait à être confirmée, nous pourrions envisager de mesurer les courants issus des récepteurs AMPA dans le champ CA1 en utilisant la technique du patch-clamp, et d'en déterminer la perméabilité sodique (chez les contrôles) ou calcique (48h après alcool). Des antagonistes spécifiques pourraient être testés afin de déterminer si la diminution du nombre de sous-unités GluA2 se traduit bien par une modification fonctionnelle des récepteurs AMPA, un résultat qui renforcerait le lien entre GluA2 et modulation de la plasticité synaptique bidirectionnelle à travers une modulation de l'influx calcique.



<u>Figure 24</u> : Schéma représentant les différentes hypothèses abordées au cours de cette discussion. Suite à deux épisodes de type binge drinking à l'adolescence, nous avons émis l'hypothèse d'une intervention précoce de la neuroinflammation, dont la diminution du TLR4 neuronal serait la conséquence, suivie du déclenchement de mécanismes épigénétiques à

travers l'augmentation de HDAC2. Cette augmentation conduirait à la surexpression de GluN2B, éventuellement de façon indirecte en passant par une sous-expression du represseur transcriptionnel REST. L'augmentation de GluN2B entrainerait une diminution du ratio GluN2A/GluN2B modifiant ainsi le seuil θ de déclenchement de la plasticité synaptique, favorisant le déclenchement de la PLT au détriment de la DLT dans l'aire CA1 et perturbant l'apprentissage. Une autre hypothèse serait une diminution de l'expression de GluA2 par la surexpression de HDAC2, responsable des modulations de plasticité synaptique et de la perturbation de l'apprentissage en modifiant la conductance calcique des récepteurs AMPA.

3- Des expositions initiales de type *binge drinking* aux expositions répétées

Une autre question soulevée suite à nos résultats est celle de l'impact du nombre et de la fréquence des épisodes de *binge drinking*. En effet, le *binge drinking* se définit comme l'alternance répétée entre des périodes d'intoxication éthylique et des périodes d'abstinence (Courtney and Polich 2009), et chez les humains qui s'adonnent au *binge drinking*, cette modalité de consommation n'est généralement pas reproduite que deux fois.

Dans ce contexte, maintenant que nous avons défini les réponses élementaires d'une répétition de deux binges dans l'hippocampe, il est nécessaire **de savoir comment évolue la plasticité synaptique lors d'une répétition de ces épisodes d'intoxication éthylique pendant toute ou partie de l'adolescence chez le rat.** De plus, nous n'avons étudié que la DLT dépendante des récepteurs NMDA sans s'intéresser à la DLT dépendante des récepteurs mGlu, alors que dans l'aire CA1, la probabilité d'induire une DLT dépendante des récepteurs mGlu augmente avec l'âge de l'animal (Kemp et al. 2000). Ainsi, en répétant les expositions à l'éthanol à l'adolescence, nous avons de fortes chances de nous rapprocher de cette fenêtre de temps durant laquelle la DLT bascule d'une forme dépendante des récepteurs NMDA à une forme dépendante des récepteurs mGlu. De plus, une abolition de la DLT mGlu-dépendante dans le champ CA1 chez des souris âgées de 6-8 semaines et soumises à des vapeurs d'EtOH en deux cycles de 4 jours (EtOH 16h/j) espacés de 3 jours a été rapportée (Wills et al., 2017). En électrophysiologie de champ, une limite notable concerne justement la détermination de

la nature des mécanismes d'induction de la DLT. En effet et malheureusement, très peu d'études identifient pharmacologiquement ces mécanismes. En théorie, il existe une multitude de protocoles de stimulations électriques permettant de déclencher préférentiellement de la DLT dépendante des récepteurs NMDA ou dépendante des récepteurs mGlu. Toutefois, en pratique, le constat est moins clair. Par exemple, *ex vivo* dans CA1, chez des animaux âgés de 21 à 35 jours et en présence d'un antagoniste des récepteurs NMDA, le protocole de stimulation pLFS 50-900 délivré à 1Hz déclenche une DLT (Nosyreva and Huber 2005) alors que ce protocole ne déclenche pas de DLT dans les travaux de Kemp et collaborateurs (Kemp et al. 2000), suggérant qu'un même protocole de stimulation électrique peut conduire à des DLT de natures différentes dans deux laboratoires différents. Finalement, une façon plus rigoureuse d'étudier ces deux types de DLT serait de déclencher celle-ci de façon chimique, en appliquant du NMDA sur la tranche pour déclencher une DLT NMDA-dépendante, et du DHPG, un agoniste des récepteurs mGlu du groupe I, lorsque l'on veut déclencher une DLT mGlu-dépendante. De cette façon, on est certain de la nature de DLT que l'on enregistre, bien que les mécanismes cellulaires puissent différer entre une induction électrique et une induction chimique. **Suite à ces précisions, il nous faudra également déterminer si les effets de l'éthanol impliquent toujours la sous-unité GluN2B. Enfin, une troisième question à laquelle répondre concernerait la durée des effets d'une exposition répétée à l'éthanol sur la mémoire et les processus cellulaires dans l'hippocampe**. En effet, nous avons montré que les effets de deux épisodes de type *binge drinking* sur la plasticité synaptique dans l'hippocampe persistent jusqu'à 4 jours après l'EtOH, alors que les travaux de Pascual et collaborateurs en 2007 montrent que les déficits mnésiques induits par huit épisodes d'intoxication éthyliques sont toujours présents à l'âge adulte. Dans ce contexte, nous pourrions supposer que les effets de l'éthanol sont d'autant plus permanents que l'exposition à l'éthanol s'est inscrite dans le temps. D'ailleurs, à ce jour, il n'y a qu'une seule étude en électrophysiologie qui s'intéresse aux effets du modèle de *binge drinking* intermittent de Pascual et coll. (2007) sur la plasticité synaptique dans CA1 (Tapia-Rojas et al. 2018). De façon intéressante, dans cette étude la PLT est abolie 7 semaines après la fin de l'exposition à l'éthanol corroborant les effets comportementaux rapportés par Pascual et collaborateurs. Toutefois, la DLT n'a pas été mesurée dans cette étude et il serait intéressant de savoir comment elle évolue et de quels récepteurs elle dépend (voir ci-dessus) au fil des expositions à l'éthanol de type *binge drinking* : est-elle définitivement bloquée ? Quelle est la

nature de la DLT éventuellement bloquée ? Finalement, est ce qu'à long terme, les modificaitons des signaux de palsticité synpatique s'inversent passant d'une augmetnaiton de la PLT apres les premières expositions à une diminution comme rapporté après de multiples expositions et récupère-t-on la DLT ?

Une autre question concernerait la capacité des substances pharmacologiques que nous avons testées dans la prévention des effets de deux expositions à l'éthanol (NaB, minocycline, indométhacine, TAK-242) à corriger les effets d'une répétition d'épisodes d'intoxication éthylique. En effet, si les études précliniques s'attachent à déterminer les mécanismes impliqués dans les effets de l'éthanol par l'administration préventive de substances pharmacologiques, il ne faut pas pour autant mettre de côté l'aspect curatif, qui est plus pertinent d'un point de vue clinique et qui doit donc être également abordé. Dans le modèle d'alcoolisation intermittente à l'adolescence de Pascual et collaborateurs, en 2007, les perturbations mnésiques induites par l'éthanol étaient prévenues par l'indométhacine administrée avant chaque injection d'éthanol (Pascual et al. 2007). Toutefois, aucune des études citées en introduction n'a testé l'efficacité d'un anti-inflammatoire administré en curatif sur les perturbations induites par l'éthanol. Du reste, la seule étude clinique qui cible la neuroinflammation chez les *binge drinkers* ne rapporte pas d'effet d'un traitement curatif à la minocycline (Petrakis et al. 2019). Concernant l'épigénétique, l'alcoolisation intermittente à l'adolescence entraine une diminution de la neurogénèse qui est corrigée par une administration de TSA à l'âge adulte, suggérant ainsi que l'on est capable de prévenir ou de corriger les effets de 8 répétitions d'épisodes de type *binge drinking* (Sakharkar et al. 2016). D'autre part, les travaux du laboratoire montrent que le NaB est capable de prévenir et reverser la sensibilisation comportementale induite par des expositions répétées à l'éthanol (Legastelois et al. 2013). Dans ce contexte, les processus épigénétiques ne seraient-ils pas les meilleurs candidats dans la correction des perturbations induites par le *binge drinking* ?

Finalement, la fréquence des *binges* semble jouer un rôle dans les déficits mnésiques chez l'humain (Wechler et al. 2000). Ainsi, il serait intéressant de comparer deux modèles d'exposition à l'éthanol de type *binge drinking au cours de l'adolescence* qui diffèrent uniquement par la fréquence. Nous pourrions comparer notre modèle de *binge drinking* répété (deux injections d'EtOH 3g/kg i.p. à 9h d'intervalle, suivi d'une journée de pause, le tout répété jusqu'à un total de 8 injections) au modèle de l'équipe de C. Guerri (deux injections

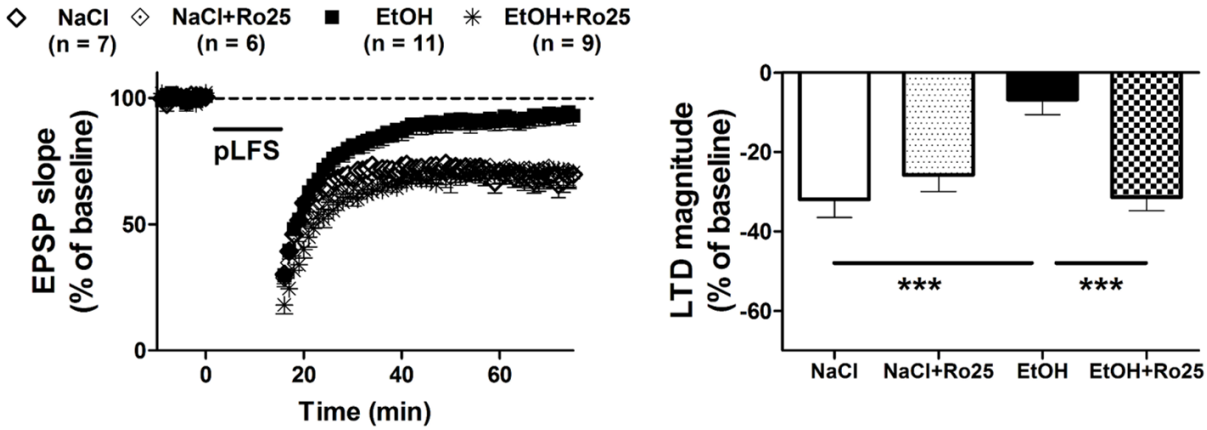
d'EtOH 3g/kg i.p. à 24h d'intervalle, suivi de deux journées de pause, le tout répété jusqu'à un total de 8 injections), qui est souvent utilisé dans notre domaine de recherche mais qui n'a toutefois pas reçu d'intérêt particulier quant à ses effets sur la plasticité synaptique dans l'hippocampe. De cette façon, nous comparerions deux modèles d'exposition dont l'un est deux fois plus fréquent que l'autre. Ainsi, cette étude serait la première à s'intéresser aux effets du *binge drinking* répété à l'adolescence sur la plasticité synaptique bidirectionnelle. Dans ce dernier contexte, des études ont récemment débuté dans notre laboratoire et permettront de répondre à une ou plusieurs des questions que nous soulevons dans cette dernière partie.

CONCLUSION GENERALE

L'enjeu de ce travail de thèse était de déterminer les mécanismes impliqués dans les effets qui apparaissent dès les premiers épisodes de type *binge drinking* chez le rat adolescent sur les processus cognitifs hippocampo-dépendants et les mécanismes cellulaires sous-jacents. Les résultats indiquent que l'éthanol met en jeu des processus épigénétiques et neuroinflammatoires responsables des perturbations mnésiques et de plasticité synaptique retrouvées après 48h dans l'hippocampe. Ces travaux suggèrent que l'éthanol exerce ses effets sur les processus mnésiques en déclenchant une neuroinflammation elle-même responsable d'adaptations épigénétiques. Cette modulation de l'épigénome et notamment de HDAC2 entrainerait à son tour une surexpression de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA dans l'aire CA1 de l'hippocampe ce qui serait à l'origine d'une perturbation de la plasticité synaptique et en conséquence, de l'apprentissage. Ce travail de thèse amène ainsi des suggestions dans l'identification des mécanismes qui déclenchent et qui relayent les effets délétères du *binge drinking* à l'adolescence et ouvre des perspectives intéressantes dans la prise en charge des déficits mnésiques chez les *binge drinkers*.

RESULTATS ANNEXES

Parmi les perspectives proposées en discussion, nous avons évoqué l'étude du rôle de GluN2B dans les altérations de plasticité synaptique et les déficits mnésiques dans le test de reconnaissance de nouvel objet suite aux deux épisodes de type binge drinking. En effet, dans ce travail de thèse, nous ne pouvons pas affirmer que c'est bien l'augmentation de GluN2B 48h après l'éthanol qui cause les perturbations de plasticité synaptique et d'apprentissage que nous rapportons. Dans ce contexte, nous avons testé l'incubation des tranches d'hippocampe issues d'animaux EtOH avec l'antagoniste de GluN2B Ro25-6981 afin de mesurer l'effet d'une diminution de l'expression de GluN2B sur l'amplitude de la PLT et de DLT et les résultats préliminaires concernant la DLT, encourageants, sont présentés ci-dessous (Figure annexe 1).



<u>Figure annexe 1</u> : Bloquer la surexpression de GluN2B *in vitro* contrecarre l'abolition de la DLT induite par l'éthanol dans CA1 après 48h. L'incubation des tranches contrôles avec le Ro25-6981 ne modifie pas l'amplitude de la DLT dans CA1 tandis que l'incubation des tranches issues d'animaux EtOH restaure de façon significative l'abolition de la DLT induite par l'éthanol. n représente le nombre de tranches, les résultats sont présentés en moyenne ± SEM, *** P < 0,001

AUTRES TRAVAUX REALISES PENDANT LA THESE

Article 1

Patch-Clamp Recording of Low Frequency Stimulation-induced Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Slices During Early and Late Neurodevelopment.

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

L'étude de la plasticité synaptique dans la tranche d'hippocampe de rat est un moyen bien établi d'analyser les mécanismes cellulaires liés à l'apprentissage et à la mémoire. Différents modes d'enregistrement peuvent être utilisés, tels que le potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) de champ extracellulaire et diverses méthodes de patch-clamp. Toutefois, la plupart des études utilisant ces méthodes n'ont été réalisées que jusqu'au stade juvénile de la maturation cérébrale, alors qu'elle se termine à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. De plus, plusieurs modèles animaux de maladies humaines ont été développés à ce stade avancé du développement cérébral. Pour étudier la vulnérabilité des rats adolescents aux perturbations cognitives induites par l'alcool, nous avons développé un modèle d'exposition de type *binge drinking* dans lequel l'éthanol abolit sélectivement la dépression à long terme (DLT) du PPSE de champ induite par stimulations à basse fréquence (SBF) dans des tranches d'hippocampe de rat. Dans la présente étude, nous avons cherché à utiliser l'enregistrement par patch-clamp de cellules entières en mode voltage-clamp pour étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans l'abolition de la DLT induite par SBF dans notre modèle d'exposition de type *binge drinking* dans des tranches d'hippocampe de rat adolescent. De plus, nous avons étudié les DLT-NMDA et mGlu dépendantes induites par SBF à différents âges et modifié plusieurs paramètres pour améliorer les enregistrements. Grâce à l'enregistrement par patch-clamp, les DLT-NMDA et mGlu dépendantes induites par SBF ont pu être mesurées jusqu'à l'âge de 4 semaines, mais pas chez les animaux plus âgés. De même, la DLT-mGlu chimique et une DLT combinée induite par SBF impliquant à la fois les récepteurs NMDA et mGlu n'ont pas été mesurées chez les animaux plus âgés. L'absence de DLT par SBF n'était pas due à la perte d'un agent intracellulaire diffusible, ni au mode d'enregistrement en voltage ou au blocage intracellulaire des courants sodiques ou potassiques. Contrairement aux enregistrements de voltage-clamp, la DLT induite par SBF testée lors d'enregistrements de champ a été mesurée à tous les âges et les effets de l'EtOH étaient visibles dans tous les cas. Nous avons conclu que les enregistrements de patch-clamp de cellules entières ne sont pas appropriés pour étudier la DLT synaptique induite par SBF chez les rats âgés de plus de 4 semaines et qu'ils ne peuvent donc pas être utilisés pour explorer les perturbations électrophysiologiques, telles que celles induites par le *binge drinking* pendant l'adolescence, correspondant à la période tardive de maturation cérébrale.

Check for updates

Alcoholism: Clinical and Experimental Research
Vol. 45, No. 2
February 2021

Patch-Clamp Recording of Low Frequency Stimulation-induced Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Slices During Early and Late Neurodevelopment

Cédric Bertrand, Chloé Deschamps, Kevin Rabiant, Stéphane Peineau, Johann Antol, Margaret Martinetti, Mickael Naassila, Catherine Vilpoux, and Olivier Pierrefiche

Background: Studying synaptic plasticity in the rat hippocampus slice is a well-established way to analyze cellular mechanisms related to learning and memory. Different modes of recording can be used, such as extracellular field excitatory post-synaptic potential (EPSP) and diverse patch-clamp methods. However, most studies using these methods have examined only up to the juvenile stage of brain maturation, which is known to terminate during late adolescence/early adulthood. Moreover, several animal models of human diseases have been developed at this late stage of brain development. To study the vulnerability of adolescent rat to the cognitive impairment of alcohol, we developed a model of binge-like exposure in which ethanol selectively abolishes low frequency stimulation (LFS)-induced, field EPSP long-term depression (LTD) in the rat hippocampus slice.

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

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

Conclusions: We concluded that whole-cell patch-clamp recordings are not suitable for studying synaptic LFS-induced LTD in rats older than 4 weeks of age and therefore cannot be used to explore electrophysiological disturbances, such as those induced by alcohol binge drinking during adolescence, which constitutes a late period of brain maturation.

Key Words: NMDAR-LTD, mGluR-LTD, Age, Patch Clamp, Field Recording, EPSPs, EPSCs.

THE CELLULAR MECHANISMS of learning and memory are related to activity-dependent synaptic plasticity, a prominent and specific property of glutamatergic synapses in the hippocampus, a cerebral structure dedicated to memory in mammals (Nabavi et al., 2014; Takeuchi et al., 2014). Synaptic plasticity is bidirectional (Collingridge et al., 2010): It may be expressed as an enhancement of synaptic transmission giving rise to long-term potentiation (LTP) or as a reduction of synaptic transmission through long-term depression (LTD). One of the approaches to study synaptic plasticity is the use of ex vivo preparations, such as parasagittal or coronal slices of rat hippocampus in which extracellular field or patch-clamp recordings in the whole-cell configuration have been used. Importantly, a majority of studies using voltage-clamp recording of synaptic plasticity in rat have not collected data beyond 1 month of age even though it is now established that brain maturation in mammals extends up to the beginning of the young adult age, or 2 months in rats and 25 years in humans (Gogtay et al., 2004; Schneider, 2013). In addition, there is growing scientific interest in studying sex differences in biological mechanisms at the age of adolescence/young adulthood when the

From the UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France; The College of New Jersey, Department of Psychology, Ewing, NJ, USA.

Received for publication July 17, 2020; accepted November 5, 2020.

Reprint requests: Olivier Pierrefiche, UMR1247 INSERM, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Chemin du Thil, 80025 Amiens, France; Tel: 33-3-22-82-79-32; E-mail: Olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Cédric Bertrand and Chloé Deschamps are equally contributed authors.

© 2020 by the Research Society on Alcoholism.

DOI: 10.1111/acer.14516

estrous cycle begins in females. Furthermore, many experimental models have been developed in adult rats for studying specific human brain-related diseases (Dawson et al., 2018; Jeanblanc et al., 2019; Spanagel, 2017; Theyel, 2018).

Studying the consequences of ethanol (EtOH) exposure during adolescence has become particularly prevalent since adolescence is a vulnerable period regarding brain maturation and increased risk of binge drinking behavior (Alaux-Cantin et al., 2013; Crews et al., 2019). Human adolescents consume large volume of alcoholic beverages in a short period of time in order to reach drunkenness rapidly, and this behavior is commonly spaced by long intervals (several days or weeks) with no alcohol drinking (Maurage et al., 2020). Many scientific teams have studied the enduring consequences of this repeated bingeing behavior during adolescence in rodent models and demonstrated prolonged EtOH-induced cognitive deficits in adulthood (Crews et al., 2019; Swartzwelder et al., 2015; 2017). In contrast, few studies have been performed to characterize the effects of fewer acute binge episodes during adolescence on the short-term cognitive performance, which could address the misconception that just a few binge drinking exposures have no impact on the brain. Furthermore, the cellular mechanisms underlying the effects of EtOH on cognitive processes are not yet fully understood. In this context, our laboratory developed a model in the adolescent rat hippocampus slice to better understand the cognitive impairing effects of only 2 high EtOH intoxication episodes, to model those observed in the young adult human population (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). With this model, we measured a selective vulnerability to low-frequency stimulation (LFS)-induced LTD that is abolished and that accompanied memory impairment long after EtOH has been eliminated from the animal. This result is highly relevant since the scientific interest toward hippocampus LTD grew largely over the last decade with determination of the role of LFS-LTD in learning and memory measured in freely moving adult rodents (Connor and Wang, 2016; Goh and Manahan-Vaughan, 2013; Kemp and Manahan-Vaughan, 2007; Liu et al., 2014; Pinar et al., 2017). In the context of LFS-LTD measurement, data collected from hippocampus slices with field recordings reveal critical information about the maturation or age dependency of this signal, which shows major changes in its properties during the first 2 to 3 weeks of life in rats (Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Dumas, 2012; Kemp et al., 2000; Overstreet et al., 1997; Sui et al., 2000; Wagner and Alger, 1995). Similarly, field-recorded LTP has been reported to decrease with age (Dumas, 2012), although others have not observed this result (Kamal et al., 1998). However, it is striking that there are no such data available with the patch-clamp recording technique. Furthermore, recording LFS-induced LTD with the patch-clamp technique at an advanced age such as adolescent/young adult rat (i.e., during the late periods of brain maturation) will enhance our understanding of the mechanisms that are disturbed in several brain-related diseases emerging at this age, such as schizophrenia or vulnerability to addiction. To the best of our knowledge, no longitudinal study has measured different forms of LFS-induced synaptic plasticity using both field and patch-clamp recordings from prepuberty to late adolescence in rat. Indeed, there is no patch-clamp study dedicated to the effects of EtOH and the analysis of EtOH-induced cellular mechanisms during the late-adolescent period despite the many advantages of this method. Therefore, the present study sought to determine whether LFS-induced LTD can be recorded with the patch-clamp technique during the late period of brain maturation at CA3-CA1 synapses in rat hippocampus slices following only 2 binges of alcohol in order to better understand our previous results (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). Strikingly, it was not possible to record LFS-induced LTD with patch clamp in the whole-cell configuration in slices from animals older than 4 weeks despite several attempts to adapt our experimental conditions. In contrast, field recordings were successful at any age.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed in agreement with the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals (2010/63/UE, CE Off. J. 20 October 2010), the French decree no. 2013-118, and the agreement of the ethics committee (CREMEAP; experiments #3829 and #8759). Male Sprague-Dawley rats were studied from the prepubertal (postnatal day P14-18) to late adolescence (P38-53) periods and were housed in a temperature (20°C) and humidity-controlled vivarium (55 ± 10%) on a 12-h/12-h light/dark cycle (light phase from 7:00 AM to 7:00 PM), and with ad libitum access to food and water. Animals were purchased from Janvier Labs (France). Prepubertal animals were housed 5 per cage with a nurturing mother and were weaned at P21. After weaning, animals were housed 2 to 3 per cage. Only males were studied here, as this study was based on a previous report from our laboratory in which only males were tested.

EtOH Treatment

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

Hippocampus Slices

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

Electrophysiology

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

Field Recording. Preparation of slices and aCSF were as described above except that we did not remove CA3 unless noted. Slices were transferred in a recording chamber continuously perfused at 6 ml/min with an oxygenated aCSF (95% O_2; 5% CO_2) and held with a nylon net. Extracellular electrodes were obtained from pulling borosilicate glass capillaries (1.5 OD × 1.17 ID × 100 L mm) and were filled with a 3 M NaCl (1 to 3 MΩ) solution. Recordings were made into the *stratum radiatum* of CA1, while Schaffer collaterals were stimulated for 0.1 ms at 0.05 Hz, at 1 to 5 mA intensity using a bipolar stimulating electrode (Platinum Iridium, FHC). Bath temperature was maintained at 28.5°C. fEPSPs were amplified (×1000 to 2000) and filtered (1 to 3 kHz) using a Grass P511 AC Amplifier (AstroNova, formerly Astro-med, Inc, West Warwick, RI) and then recorded using a CED Micro3 1401 acquisition unit (CED, Cambridge, UK) coupled to a computer. An input/output (I/O) curve was established for each slice, and protocols of LTD induction were performed at 50% of the maximal response obtained from the I/O curve. Data were stored and analyzed using Signal software (CED).

Plasticity Protocols. For whole-cell patch-clamp recordings (Collingridge et al., 2010), a stable Excitatory Post-Synaptique Current (EPSC) baseline period of 10 minutes was achieved, and then NMDAR-LTD was induced in P14-21 rats with 300 single-square pulses delivered at 0.66 Hz, while the membrane potential of the neuron was held at −40 mV (LFS300). To induce mGluR-LTD, we used 300 pairs of stimulation with a 200-ms interval delivered at 0.66 Hz while holding the membrane potential at −70 mV (pLFS200-300) in P14-21 rats and 900 pairs of stimulation with a 200 ms interval (pLFS200-900) at 1 Hz and at a −70 mV holding potential for older animals. To induce a combined LTD (i.e., NMDAR- + mGluR-LTD), we used the pLFS200-900 mGluR-LTD protocol at 1 Hz while holding the membrane potential at −40 mV. When performing patch-clamp recording in current-clamp mode, we tested LFS900 applied at 5 Hz (Oliet et al., 1997). In field recording conditions, we examined the NMDA-dependent form of LTD (Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992). After a stable EPSP baseline of 10 minutes, LTD was induced with a LFS900 single-pulse protocol delivered at 1 Hz in 3-week-old animals, whereas in older animals, we used pLFS200-900 at 1 Hz. See Table 1 for a summary of the different protocols used.

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

Statistical Analyses and Data Representation. For synaptic plasticity, we compared the mean amplitude of a 10-minute baseline recording taken before LTD to the mean amplitude of the last 10-minute recording after LTD induction. All data are presented as mean ± SEM with N = representing the number of animals and n = the number of cells or slices recorded. Statistical analysis of synaptic plasticity was performed with unpaired Student t-tests. In all tests, we defined $p < 0.05$ as significant.

RESULTS

Effects of EtOH on LFS-Induced LTD With Field and Whole-Cell Patch-Clamp Recordings

Adolescence is a vulnerable period for the consumption of drugs of abuse and many of those substances elicit memory impairment through disturbances of synaptic plasticity in the hippocampus. We thus tested the effects of 2 acute EtOH intoxication episodes on NMDA-dependent, pLFS200-900-induced homosynaptic LTD of fEPSPs (Kemp et al., 2000) in late-adolescent rat hippocampus slices (P46-P53). The results showed that 48 hours after EtOH exposure, synaptic LFS-induced LTD was abolished (Fig. 1*A1-A2*). Control LTD reached 74% ± 2% ($p < 0.001$; $n = 4$) of baseline values, whereas after EtOH, LTD magnitude was 97% ± 3% ($p < 0.001$ compared to control; $n = 5$). Surprisingly, we failed to obtain a similar result using the whole-cell patch-clamp recording; there was no pLFS200-900-induced LTD

Table 1. The Different Protocols Used With Patch-Clamp Recording to Trigger Either NMDAR- or mGluR-LTD According to the Age of the Animal

Type of LTD	3- and 4-week-old rats (name/frequency/Vh)	5 to 7 weeks old (name/frequency/Vh)
NMDAR-1.TD	LFS300/0.66 Hz/-40 mV	lFS300/0.66 Hz/-40 mV
mGluR-LTD		
Electrically induced	plFS200-300/0.66 Hz/ 70 mV	plFS200900/1 Hz/70 mV
Chemically induced		DHPGSO μM
Combined LTD		plFS200-900/1 Hz/-40 mV plFS200-300/1 Hz/-40 m

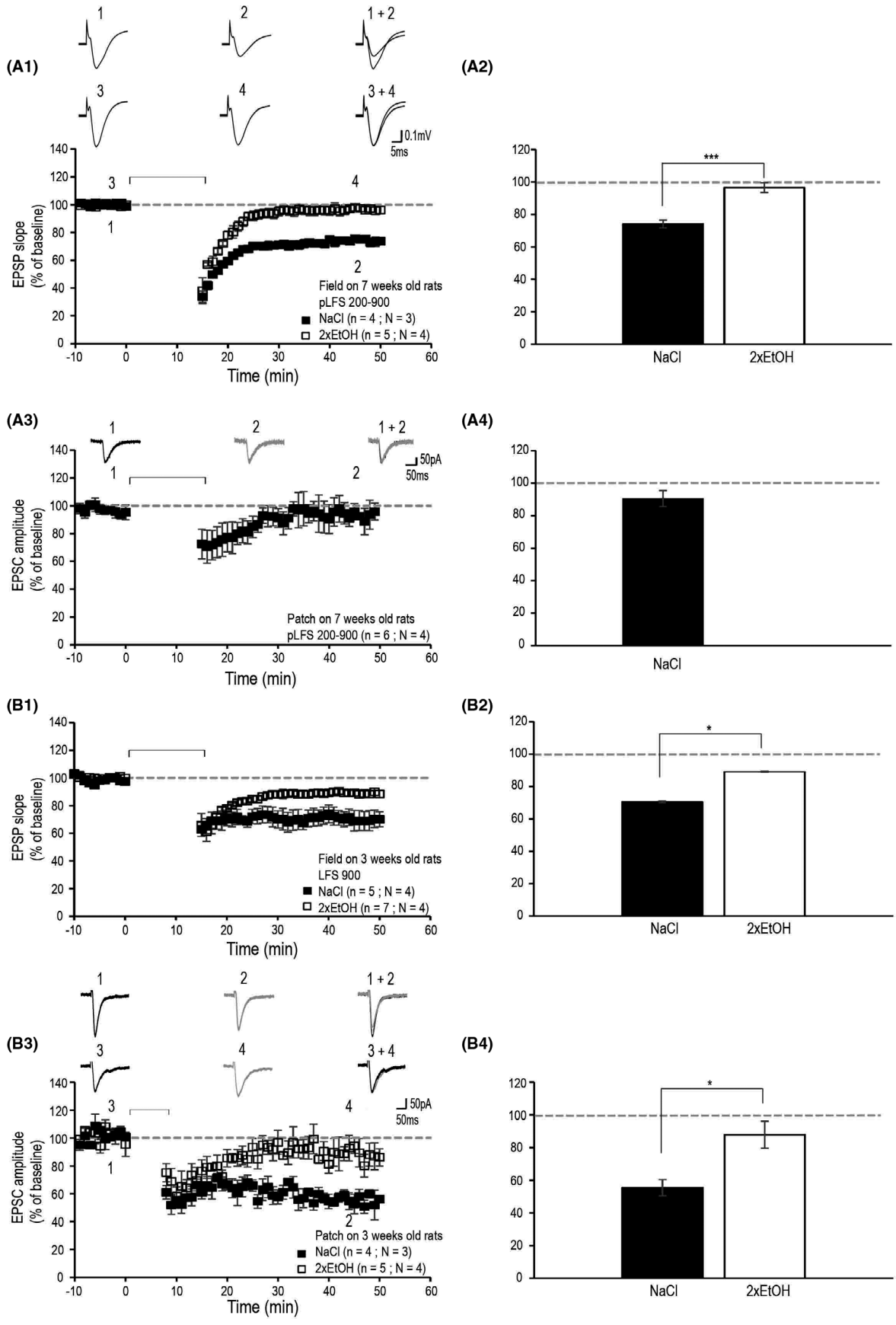

(A1)
1
2
1 + 2
3
4
3 + 4
0.1mV
5ms
EPSP slope (% of baseline)
Field on 7 weeks old rats
pLFS 200-900
NaCl (n = 4 ; N = 3)
2xEtOH (n = 5 ; N = 4)
Time (min)
(A2)
***
NaCl
2xEtOH
(A3)
50pA
50ms
EPSC amplitude (% of baseline)
Patch on 7 weeks old rats
pLFS 200-900 (n = 6 ; N = 4)
Time (min)
(A4)
NaCl
(B1)
EPSP slope (% of baseline)
Field on 3 weeks old rats
LFS 900
NaCl (n = 5 ; N = 4)
2xEtOH (n = 7 ; N = 4)
Time (min)
(B2)
*
NaCl
2xEtOH
(B3)
EPSC amplitude (% of baseline)
Patch on 3 weeks old rats
NaCl (n = 4 ; N = 3)
2xEtOH (n = 5 ; N = 4)
Time (min)
(B4)
*
NaCl
2xEtOH

Fig. 1. Effects of EtOH intoxication on homosynaptic NMDA-dependent LTD in CA1 area. (**A1-A2**) Extracellular EPSP field recordings in control slices (**A1**: $N = 3$; $n = 4$) and slices from animals treated with EtOH (2 × 3 g/kg, i.p.) 48 hours before electrophysiology (**A2**: $N = 4$; $n = 5$). Upper traces are averaged recordings taken at time points indicated 1, 2, 3, and 4 in the time course of LTD. **(A3-A4)** No LFS-induced LTD with the whole-cell patch-clamp technique in CA1 pyramidal neuron of similar aged animal than in (**A**). (**B1-B2**) Extracellular EPSP field recordings in control slices (**B1**: $N = 4$; $n = 5$) and slices from 3-week-old animals treated with EtOH (2 × 3g/kg, i.p.) 48 hours before electrophysiology (**B2**: $N = 4$; $n = 7$). (**B3-B4**) Whole-cell patch-clamp recordings performed in animals younger than 3 weeks showed an abolition of NMDA-dependent LTD 48 hours after EtOH (control $N = 3$; $n = 4$ and EtOH $N = 4$; $n = 5$). Calibration bars: 50 pA/50 ms. "*N*" is the number of animals and "*n*" the number of cells or slices.

at this age (Fig. 1*B1-B2*). Indeed, 50 minutes after LFS-induced LTD, patch-clamp recordings of EPSCs indicated 93% ± 5% ($p = 0.48$; $n = 6$) of baseline values. Field recordings performed at 3 weeks of age demonstrated the presence of LTD and its abolition 48 hours after EtOH (Fig. 1*B1-B2*). Here LTD reached 70 ± 6% of baseline ($n = 5$) in control animals and 90 ± 2% of baseline ($n = 7$) in EtOH-treated animals ($p < 0.05$ compared to control). Interestingly, we obtained a comparable abolition of LFS-induced NMDA-LTD recorded with the patch-clamp technique in younger animals at P14-P21 (Fig. 1*C1-C2*). Control pLFS200-900 LTD reached 54% ± 3% ($p < 0.001$; $n = 4$) of baseline values, whereas 48 hours after the EtOH intoxications, LTD was 88% ± 7% ($p < 0.05$ compared to control; $n = 5$). This first series of experiments replicate our previous results obtained with field recordings (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015) and extends it to 3-week-old rats. However, we could not replicate those results using patch-clamp recordings above 3 weeks of age, revealing that the analysis of specific transmembrane currents targeted by EtOH with this method is not possible during the late-adolescent period, that is in 7-week-old animals. To better understand the discrepancies between patch-clamp and field recordings during late brain maturation, we decided to further investigate the conditions of LFS-induced LTD in patch-clamp recordings.

No LFS-Induced LTD in Late-Adolescent Rat Hippocampus Slices Recorded With Patch Clamp

We first tested whether synaptic NMDAR-LTD could be induced in CA1 pyramidal neurons of hippocampus slices from late-adolescent rats using the patch-clamp recording technique in the whole-cell configuration, while Schaffer collaterals were electrically stimulated with the LFS protocol. The results showed that 50 minutes following LFS300 at a −40 mV holding potential, EPSC amplitude was 98% ± 3% of baseline (Fig. 2*A1–A2*; $p = 0.38$; $n = 11$). In order to rule out the possibility of unfavorable recordings conditions that would lead to a blockade or an absence of NMDA currents, we used CNQX, a competitive AMPA/kaïnate receptor antagonist. CNQX was bath-applied at 10 μM, while holding potential was set at −70 mV. When AMPA currents were blocked, the NMDA currents were measured by holding the membrane potential at −40 mV (Fig. 2*B*), demonstrating that NMDA currents were present to trigger an NMDAR-LTD in our experimental conditions. Next, we tested the induction of group-1 metabotropic glutamate receptors-LTD (i.e., mGluR-LTD) in slices from P38-46 rats since older animals did not respond (Fig. 1*B*). Similarly, to NMDAR-LTD, we failed to induce mGluR-LTD. Indeed, 50 minutes following induction, the EPSC amplitude reached 97% ± 6% of baseline values (Fig. 2*C1-C2*; $p = 0.69$; $n = 5$). Since both NMDAR- and mGluR-dependent synaptic LTD were not induced separately in hippocampus slices from late-adolescent rats, we investigated whether a more robust LTD combining both types of receptors could be obtained. To induce a so-called combined synaptic LTD, we used an LFS protocol that recruited mGlu receptors, while the holding potential was set at −40 mV to recruit NMDA receptors (Fig. 3*A1-A2*). In these conditions, the EPSC amplitude was 93% ± 5% of baseline ($p = 0.19$; $n = 7$) 50 minutes following the induction protocol, showing that this combined form of LTD was not triggered in late-adolescent rats. Because mGluR-LTD can also be induced pharmacologically, we tested the group 1 mGluR agonist, DHPG which was bath-applied at a 50 μM concentration for 10 minutes before being washed out (Fig. 3*B1-B2*). In these conditions, 50 minutes following DHPG application, EPSC amplitude was 101 ± 4% of baseline ($p = 0.87$; $n = 5$) revealing no chemically induced mGluR-LTD, although DHPG decreased synaptic currents since 5 minutes following DHPG application, EPSC amplitude was 69% ± 7% of baseline ($p < 0.01$; $n = 5$).

Age Dependency of LTD Using Patch-Clamp Recording Technique and LFS Protocols

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

These results were then extended to animals from 3 to 7 weeks of age (i.e., ranging from prepuberty to late adolescence; Fig. 5), in order to find a precise age at which the capacity to record an LFS-induced LTD with whole-cell patch clamp is lost. For this purpose, we compiled all types of LTD at the different ages tested. Thus, at 3 weeks of age (P14-21), both NMDAR- and mGluR-LTD could be

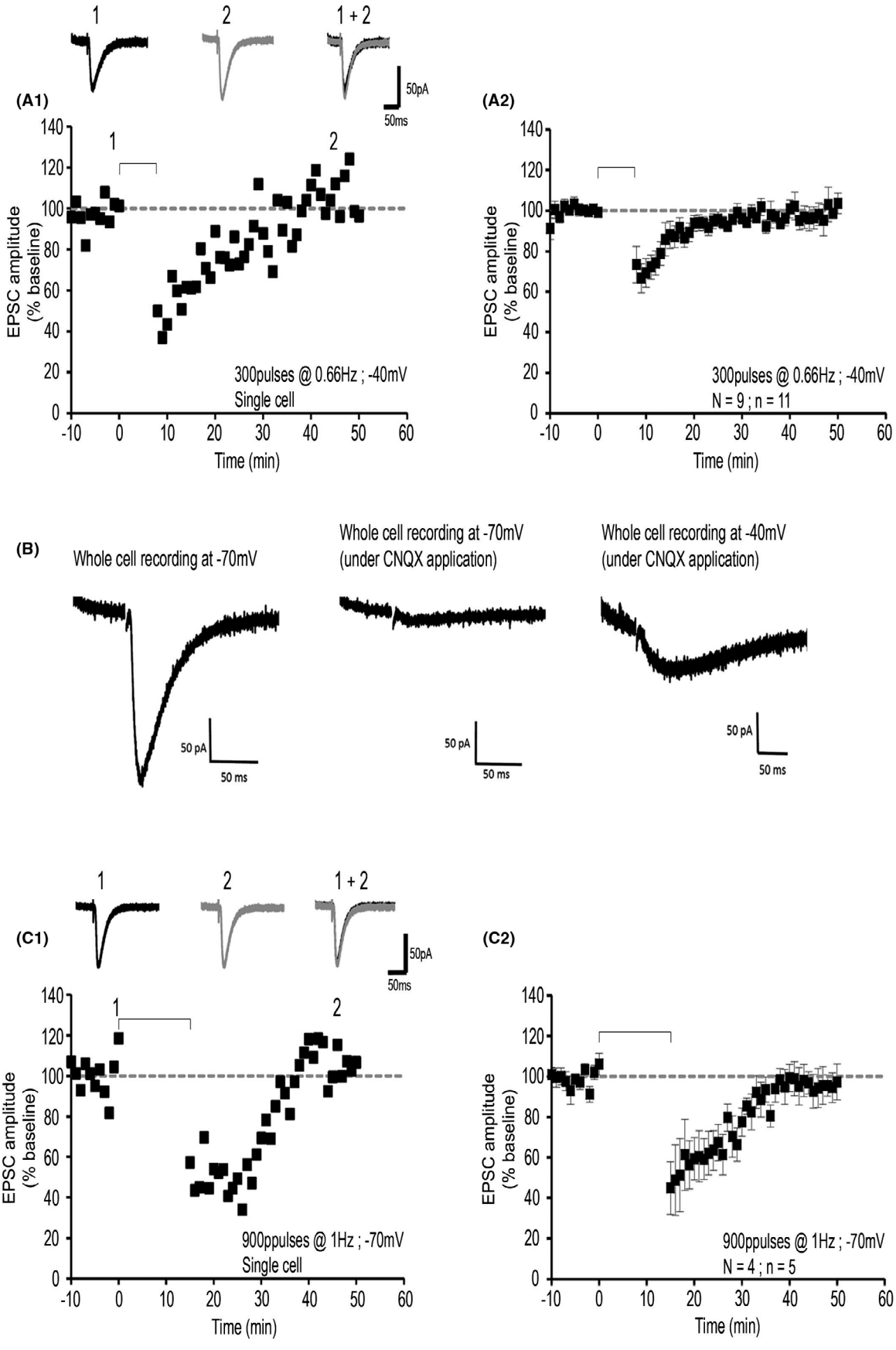

(A1)
1
2
1 + 2
50pA
50ms
EPSC amplitude (% baseline)
300pulses @ 0.66Hz ; -40mV
Single cell
Time (min)
(A2)
300pulses @ 0.66Hz ; -40mV
N = 9 ; n = 11
Time (min)
(B)
Whole cell recording at -70mV
Whole cell recording at -70mV (under CNQX application)
Whole cell recording at -40mV (under CNQX application)
50 pA
50 ms
(C1)
900ppulses @ 1Hz ; -70mV
Single cell
(C2)
900ppulses @ 1Hz ; -70mV
N = 4 ; n = 5

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

induced and recorded with patch clamp with an EPSC amplitude reaching 53 ± 4% ($p < 0.001$; $n = 14$ cells including 7 for each type of LTD) of baseline, 50 minutes after LTD induction (Fig. 5*A1*). At 4 weeks of age (P22-29) EPSC amplitude reached 76 ± 6% ($p < 0.01$; $n = 7$ cells including 6 for NMDAR-LTD and 1 for mGluR-LTD; Fig. 5*A2*). However, at 5 weeks (P30-37), 6 weeks (P38-45), and 7 weeks (P46-53) of age, patch-clamp-recorded LTD was never induced with any LFS protocol (14 cells for NMDAR-LTD, 5 for mGluR-LTD, and 7 for combined LTD; Fig. 5*A3-A4*). More precisely, 50 minutes following LTD induction, EPSC amplitude was 100 ± 3% ($p = 0.95$; $n = 6$), 95 ± 3% ($p = 0.12$; $n = 9$), and 97 ± 3% ($p = 0.34$; $n = 11$) of baseline at 5, 6, and 7 weeks of age, respectively. Altogether, no LFS-induced LTD was recorded from rats older than 4 weeks of age (Fig. 5*C1*).

Patch-Clamp Versus Field Recordings

In our experimental conditions, the patch-clamp recording technique did not allow the recording of LFS-induced LTD in hippocampus slices from rats older than 4 weeks. We next

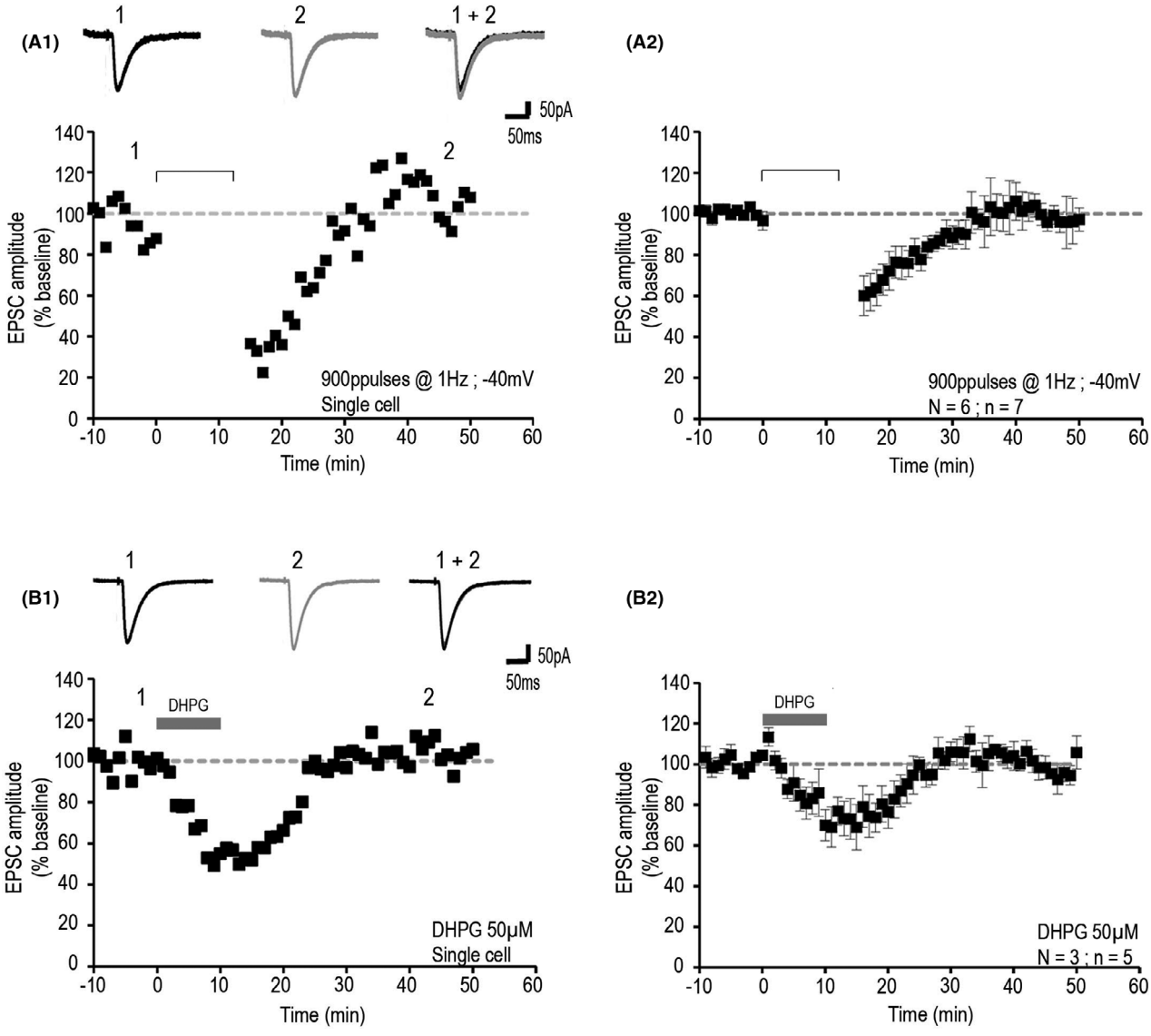


Fig. 3. No combined LTD and no chemical mGluR-LTD in hippocampal slices of adolescent (P38-45) rats with whole-cell patch-clamp recording. Representative EPSC traces, single example (**A1**), and pooled data (**A2**) illustrating a combined NMDAR- and mGluR-LTD ($N = 6$; $n = 7$). (**B**) Representative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

asked whether the same result could be observed with the field recording technique. Using the same range of age as those tested with patch clamp and measuring specifically NMDAR-LTD (Fig. 5*B,C*), we found that the induction of NMDA-LTD was always successful from 3 to 7 weeks of age. In these conditions, 50 minutes following the induction protocol, EPSP slope at 3 weeks was 69 ± 5% ($p < 0.01$; $n = 4$, $N = 4$) of baseline; at 4 weeks, values reached 75 ± 4% ($p < 0.001$; $n = 5$, $N = 3$); at 5 weeks, it reached 79 ± 3% ($p < 0.001$; $n = 4$, $N = 2$); at 6 weeks of age, EPSP slope was 74 ± 2% ($p < 0.001$; $n = 4$, $N = 3$); and in 7-week-old rats, it was 70 ± 7% ($p < 0.01$; $n = 4$, $N = 3$) (Fig. 5*B1-B2*). Thus, in comparison with patch-clamp recording, field recording was successful at all ages tested (Fig. 5*C1-C2*).

The Wash-Out Hypothesis and LFS-Induced LTD in a Configuration Close to Field Recording

Considering the difference between field and patch-clamp recordings, we tested the hypothesis that an unidentified component necessary to induce synaptic LTD in slices from adolescent rats could be washed out during the patch-clamp recording, as was shown with synaptic LTP in rats (Malinow and Tsien, 1990). To test this hypothesis, we attempted to induce a combined LTD (i.e., mGluR- + NMDAR-LTD) applied within 5 minutes of recording in the whole-cell configuration. The results showed that EPSC amplitude was 107 ± 6% of baseline ($p = 0.3$; $n = 5$), 50 minutes following such a protocol of LTD induction (Fig. 6*A1-A2*). A final attempt to induce LTD with the patch-clamp technique was performed, while replicating the experimental conditions of field recordings as closely as possible. First, we tested the whole-cell configuration recording in current-clamp mode and adapted our stimulation protocol according to Oliet and colleagues (1997): We used LFS900 delivered at 5 Hz (Fig. 5*B1-B2*) in a medium containing 4 mM of each Ca^{2+} and Mg^{2+} (Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio = 1). In these conditions, EPSC amplitude was 98 ± 4% of baseline ($p = 0.6$; $n = 3$) 50 minutes following the stimulation. Second, in a similar condition, we adapted the intracellular recording solution, removing QX-314 to release voltage-activated sodium channels and replacing $CsMeSO_3$ with $KMeSO_3$ to release potassium channels. In these conditions, EPSC amplitude was 95 ± 4% of baseline ($p = 0.27$; $n = 5$) 50 minutes following LFS900 at 5 Hz as used in current-clamp mode (Fig. 5*C1-C2*).

DISCUSSION

Based on our previous results showing the abolition of LFS-induced LTD during late adolescence after 2 alcohol binge-like episodes using extracellular field recordings, we sought to use patch-clamp recording to determine the mechanisms of synaptic plasticity that are disturbed by EtOH at this late stage of brain development. Surprisingly, we failed to measure an LFS-induced LTD with whole-cell patch-clamp recordings in late-adolescent rats and we thus investigated the mechanism and the developmental factors underlying this technical discrepancy. In contrast to patch clamp, we found that LTD abolition after only 2 binges can be measured from 3 to 7 weeks of age.

Hippocampus LFS-Induced LTD and EtOH Exposure During Adolescence

It is now well established that EtOH exposure during adolescence in rodents may lead to some cognitive and behavioral deficits long after a period of abstinence that extends into adulthood (Alaux-Cantin et al., 2013; Crews et al., 2019; Swartzwelder et al., 2015; Swartzwelder et al., 2017). However, the cellular mechanisms responsible for such long-term disturbances of learning and memory are still under investigation. This is particularly important with respect to the adolescent period because brain maturation is still occurring in mammals, including humans (Gogtay, 2004), suggesting that EtOH interferes with major late-developmental brain processes. Therefore, identifying the mechanisms of action of EtOH exposure during adolescence, especially those occurring after just a few exposures, may help to understand what cellular processes are key players in the long-lasting disturbances. In this context, we showed here that hippocampus LFS-LTD is abolished in late but also in early adolescent periods in rats 48 hours after only 2 EtOH binges. This finding is consistent with our previous work and extends it to the 3-week-old animals (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015). This selective abolition in late adolescence, concomitant with learning deficits, and accompanied with a high level of GluN2B (Drissi et al., 2020; Silvestre de Ferron et al., 2015) needs to be further understood. To this end, the use of patch-clamp recordings seemed appropriate as it allows transmembrane currents and cell specific plasticity analysis; however, we found that during late adolescence in rat, LFS-LTD was not measured with the patch-clamp technique. Although this study is the first attempt to test patch-clamp recording during late brain development after EtOH exposure, we believe that successful use of this technique at this age could provide an important methodological contribution since juvenile animals (i.e., younger than P30; Schneider, 2013) are not submitted to the same physiological, hormonal and social modifications than adolescent, that all participate in the final maturation of brain networks.

Lack of LFS-Induced LTD Using Whole-Cell Voltage-Clamp Recording in Adolescent Rat

The literature shows that synaptic transmission and plasticity are frequently measured with the field recording technique, while the use of patch clamp is less common. The choice between these 2 approaches is naturally related to the scientific question since patch clamp is dedicated mainly to the study of transmembrane currents, whereas field recording

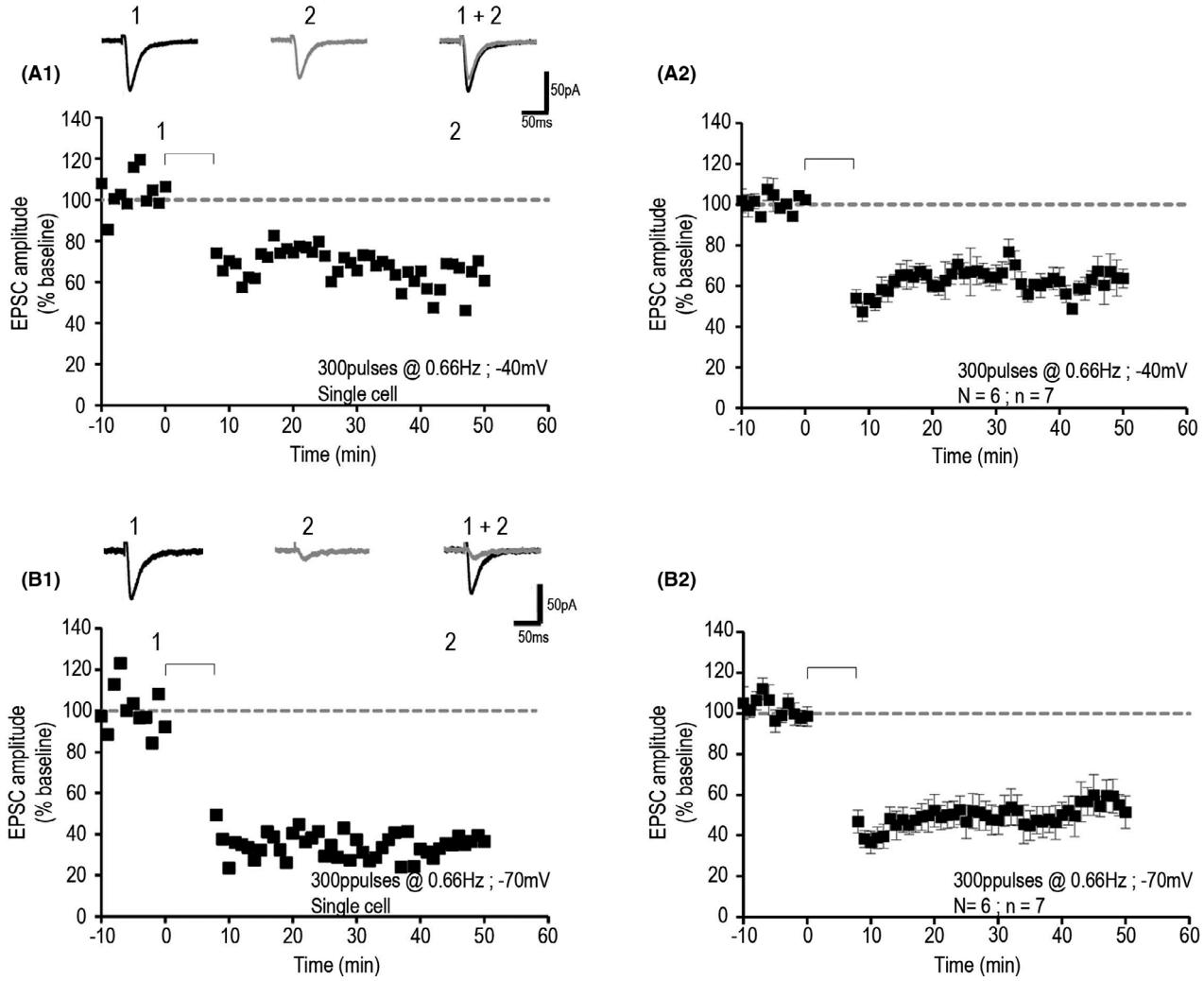


Fig. 4. NMDAR- and mGluR-LTD in hippocampal slices of juvenile (P14-21) rats with whole-cell patch-clamp recordings. (**A**) Representative EPSC traces, single example (**A1**), and pooled data (**A2**) illustrating NMDAR-LTD ($N = 6$; $n = 7$). (**B**) Representative EPSC traces, single example (**B1**),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

demonstrates the presence (or absence), and the quality of induced plasticity. Although whole-cell voltage-clamp recording is more difficult to perform than field recording, studying synaptic plasticity with patch clamp allows pharmacological manipulation of the internal compartment of the recorded neuron and the investigation of cell-type-specific plasticity. These benefits are especially noteworthy given that long-lasting recording of LTD with the patch-clamp technique has been already reported despite the technical problems that may be encountered (Collingridge et al., 2010; Oliet et al., 1997). In addition, whole-cell recordings from patch clamp allow LTD to be induced using several different stimulating protocols because the membrane potential of the recorded postsynaptic cell can be altered. LTD can also be induced by appropriately timed back-propagating action potentials in current-clamp mode. In this latter case, the resulting plasticity is a form of spike-timing-dependent plasticity (STDP).

In the current study, and using late-adolescent animals (P38-P45), we found that an NMDAR-dependent form of LTD in the CA1 area was not induced with voltage clamp. This finding was surprising, as the NMDAR current was present in our conditions and thus, it should have been possible to induce an NMDA-dependent LTD following the electric induction protocol. A similar lack of LTD was found when we tested mGluR-dependent LTD induced either with an electric LFS or with bath application of DHPG, an agonist of mGlu type I receptors. Finally, at this age, we were unable to induce an LTD that combined both types of glutamate receptors recruited during the induction protocol. In total, these results suggest that LTD is not induced at this age in CA1 area of hippocampal coronal slices of rat or, alternatively, that whole-cell voltage-clamp technique is not well suited for LFS-induced LTD recordings at this late stage of brain maturation. The latter case is supported by the fact we were able to record LTD at younger ages. Indeed, testing the

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

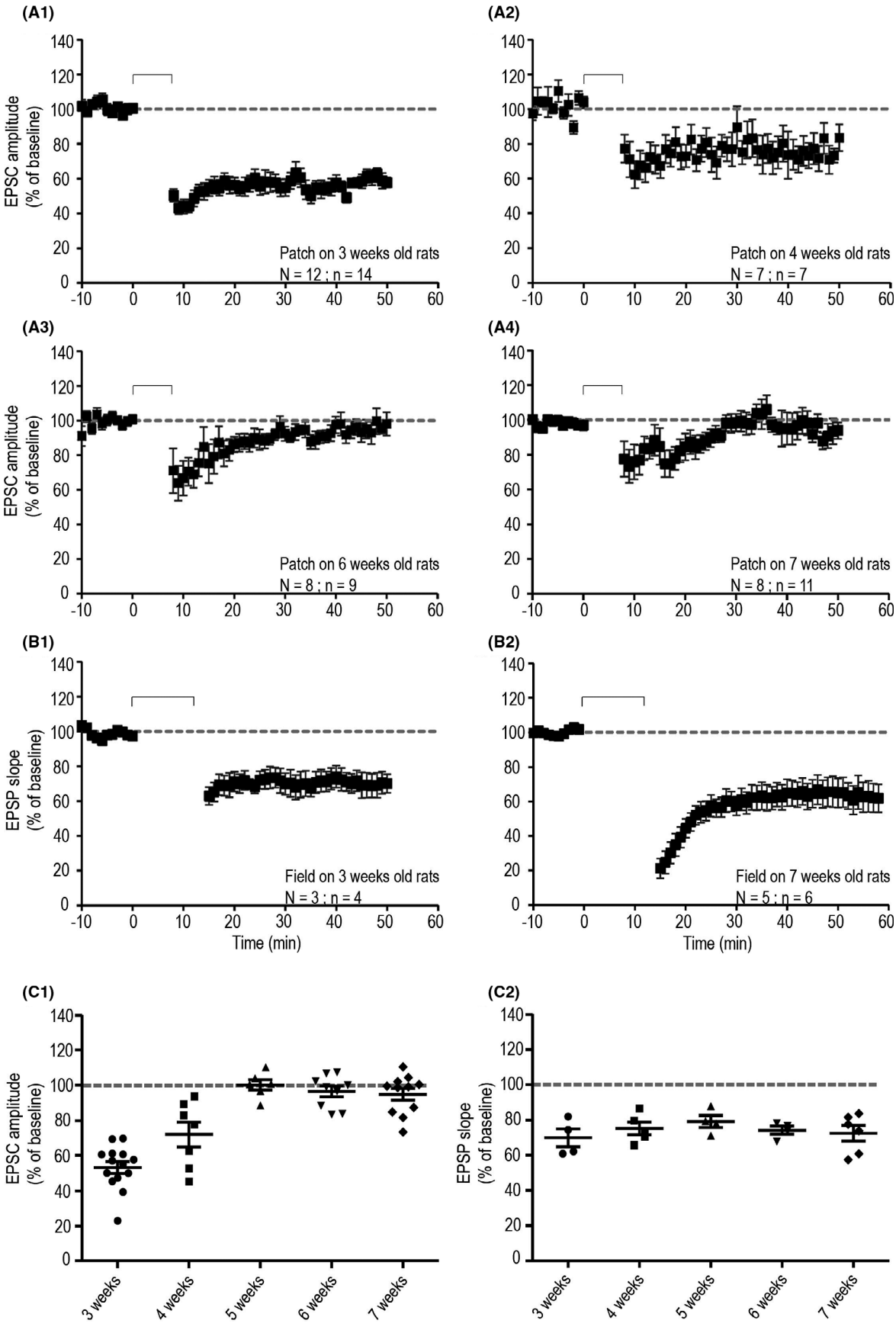
induction of LTD in younger animals showed that both NMDAR- and mGluR-dependent LTD were recorded with whole-cell patch clamp using the same LFS as that used in older animals and a protocol adapted for a younger age. More precisely, we conclude that LFS-induced LTD cannot be recorded with patch clamp once the animals reached 4 weeks of age (i.e., 28 days) since at this age and older, none of the 3 different types of LTD we tested was evoked. To explain the lack of LFS-induced LTD after 4 weeks of age, we examined whether changing the experimental conditions of recordings during this second month of life in rats would alter the outcomes.

Changing the Experimental Conditions Did Not Help Recording LTD With Voltage-Clamp

To better understand the lack of LFS-induced LTD in P38-P45 old animals recorded with patch clamp, we tested several possibilities. First, we tested whether an intracellular diffusible agent necessary for the development of synaptic plasticity was lost within the first minutes of the formation of the whole-cell configuration (Kullmann and Lamsa, 2007). Second, we tested the idea that recordings of LFS-induced LTD were not possible in voltage-clamp mode, but could be performed in current-clamp mode. Third, we hypothesized that the composition of the intracellular solution used in voltage clamp does not allow LFS-induced LTD to develop. Interestingly, independent testing of each of these 3 possibilities never revealed an LTD, suggesting that none of these parameters were dramatically involved in the lack of LFS-induced LTD in hippocampus slices from late-adolescent animals. Furthermore, changing the Mg^{2+}/Ca^{2+} ratio to 4 mM/4 mM in whole-cell current-clamp recordings and adapting the induction protocol to the literature (Oliet et al., 1997) did not affect the outcome. Another factor to take into account is the amount of inhibition while recording LTD. In fact, GABA inhibitions have been shown to constrain LTD (Wagner and Alger, 1995). However, in our experiments, all patch-clamp recordings were performed in the presence of bicuculline and in the absence of the CA3 field thereby strongly reducing the amount of synaptic inhibition into the network. Thus, our results suggest that GABA-A receptor inhibitions cannot account for the lack of LTD recorded with the whole-cell patch-clamp technique at the later stage of development. In this context, an interesting comparison could be made with the findings of (Meredith et al., 2003), who also used whole-cell patch-clamp recordings. In this study, the authors showed that the synaptic plasticity rules to trigger LTP evolve with the age of the animals from P9 to P45 due to GABA-A synaptic transmission, which was reversed in the presence of bicuculline. With respect to glutamate-related mechanisms, postsynaptic mGluRs are localized preferentially in the perisynaptic/extrasynaptic zones (Luján et al., 1996) and the use of a membrane glutamate-transporter inhibitor such as TBOA could have possibly induced mGluR-LTD in adolescent animals. However, we tested an induction protocol known to trigger mGluR-dependent LTD and we bath-applied an mGluR agonist, and neither method was successful to induce LTD in older animals, thereby ruling out inactive mGluRs as a possible reason for the discrepancy. Finally, high-resistance pipettes have been shown to reveal mGluR-dependent LTD in CA1 neurons of cultured slices (Fan et al., 2010). However, this result would suggest that a diffusible factor was lost with low-resistant recording pipettes, a possibility we can rule out based on our recordings performed within 5 minutes following the breaking of the seal.

Field Recordings Are More Reliable Than Patch-Clamp Recordings for LFS-Induced LTD

In contrast to voltage-clamp recordings, we found that field recordings of LFS-induced LTD using an induction protocol known to trigger NMDAR-dependent LTD were successful during the period of P14 to P45 in rat hippocampus slices (Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992). Many studies have revealed that in CA1, LTD is easily obtained in neonates, while its magnitude is much lower in more mature animals (Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Sui et al., 2000; Wagner and Alger, 1995), and that these findings do not vary across rat strain. In Wistar rats, for example, Sui and colleagues (2000) reported that synaptic LTD triggered with LFS900 decreased in amplitude with age, to about 70% of baseline. Another study demonstrated LTD of fEPSPs with a prolonged stimulation of the Schaffer collateral-commissural fibers at 5–10 Hz frequencies in hippocampus slices from 30- to 40-day-old Wistar rats (Berretta and Cherubini, 1998). Using another type of induction protocol in slices from P14- to P252-day-old Wistar male rats, Kamal and colleagues (1998) found a decrement in LTD magnitude between young and old animals in fEPSP analysis. Similar results were obtained using Sprague-Dawley rats in which LFS900-induced LTD declined in amplitude from 70% to 94% of baseline (Dumas, 2012; Escobar et al., 2011), with the decline beginning around the third week of life. These results revealed the maturation profile of LFS-induced LTD that occurs in all strains of laboratory rat studied thus far. These results also show that LTD maturation can be observed with many different induction protocols (Kemp et al., 2000). Our results using


(A1)
EPSC amplitude (% of baseline)
Patch on 3 weeks old rats
N = 12 ; n = 14
(A2)
Patch on 4 weeks old rats
N = 7 ; n = 7
(A3)
Patch on 6 weeks old rats
N = 8 ; n = 9
(A4)
Patch on 7 weeks old rats
N = 8 ; n = 11
(B1)
EPSP slope (% of baseline)
Field on 3 weeks old rats
N = 3 ; n = 4
(B2)
Field on 7 weeks old rats
N = 5 ; n = 6
Time (min)
(C1)
EPSC amplitude (% of baseline)
(C2)
EPSP slope (% of baseline)
3 weeks
4 weeks
5 weeks
6 weeks
7 weeks

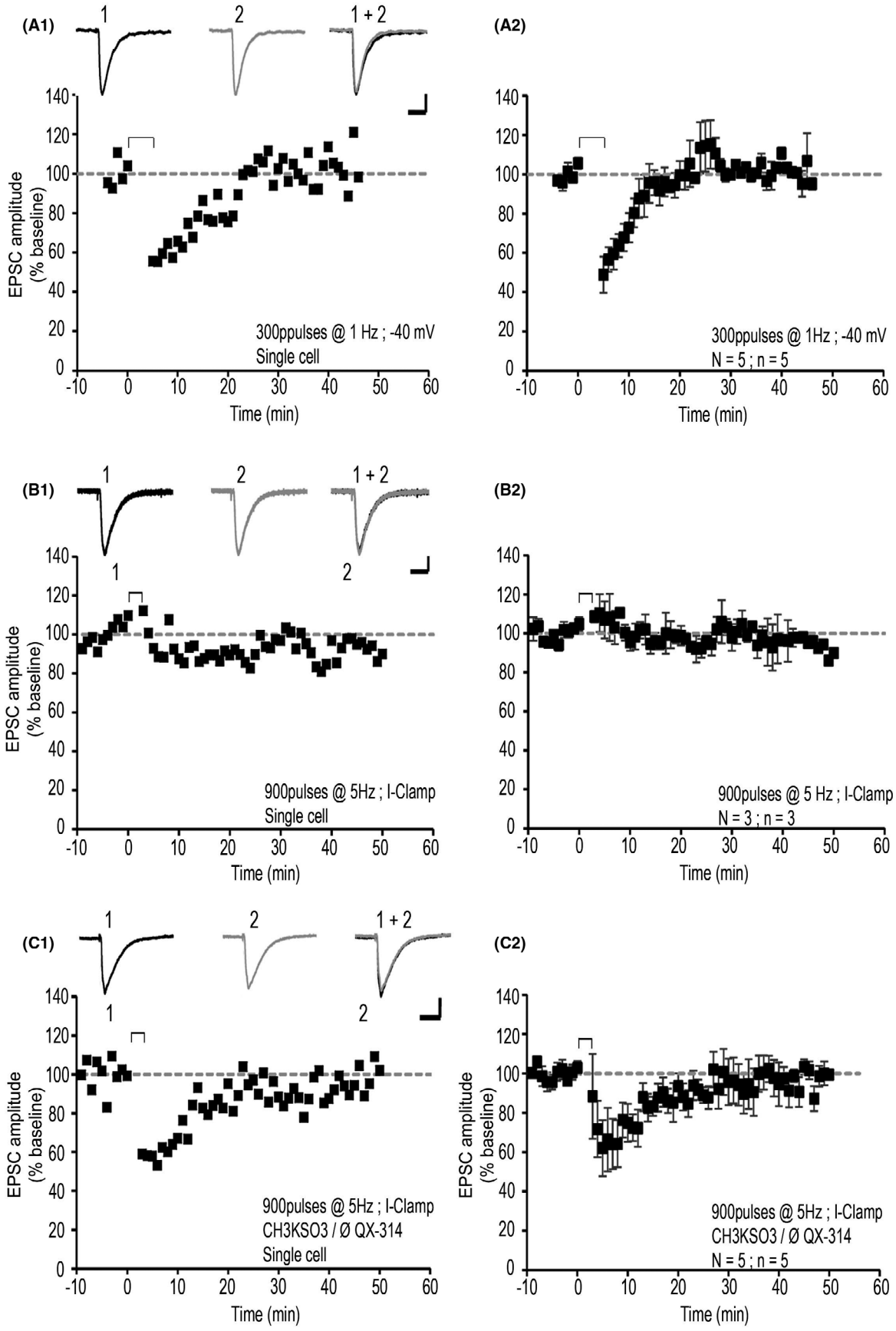

(A1)
1
2
1 + 2
EPSC amplitude (% baseline)
300ppulses @ 1 Hz ; -40 mV
Single cell
Time (min)
(A2)
300ppulses @ 1Hz ; -40 mV
N = 5 ; n = 5
Time (min)
(B1)
900pulses @ 5Hz ; I-Clamp
Single cell
Time (min)
(B2)
900pulses @ 5 Hz ; I-Clamp
N = 3 ; n = 3
Time (min)
(C1)
900pulses @ 5Hz ; I-Clamp
CH3KSO3 / Ø QX-314
Single cell
Time (min)
(C2)
900pulses @ 5Hz ; I-Clamp
CH3KSO3 / Ø QX-314
N = 5 ; n = 5
Time (min)

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

field recordings in Sprague-Dawley rats are consistent with this literature (Dumas, 2012; Escobar et al., 2011) since we found a small, but progressive reduction in LTD amplitude between 3 and 4 weeks of age when we used LFS900, and then a stable LTD magnitude beyond 4 weeks of age reaching about 70% of baseline. Given the existing literature, it is unlikely that the LFS protocols we used were not suited for triggering LTD in the voltage-clamp mode since in the rat hippocampus, the LFS and pLFS protocols are usually sufficient (Bliss and Collingridge, 1993; Collingridge et al., 2010; Dudek and Bear, 1992; Kemp et al., 2000; Mulkey and Malenka, 1992).

Limits of the Study

Our present study is necessarily incomplete in the sense that we did not exhaust all possible ways to improve our whole-cell patch-clamp recordings; however, the literature is quite limited on this topic. Indeed, and to the best of our knowledge, there is only 1 other paper reporting patch-clamp recordings of LTP (and depotentiation) in hippocampus slices from 80- to 90-day-old rats (Tozzi et al., 2019). This latter study suggests that space-clamp error is not the origin of the failure in LTD recordings in slices from adolescent and mature animals. Nonetheless, some differences exist between our protocol and the experimental conditions used by Tozzi and colleagues (2019). They illustrated LTP in adult rats using slices somewhat thinner than ours (250 μm compared with 400 μm), a higher recording temperature (34°C vs. 22°C), and a recorded neuron that may have had a higher basal level of intracellular free calcium. More precisely, Tozzi and colleagues used 0.1 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$ in the presence of 0.1 mM EGTA, whereas we used no intracellular $MgCl_2$ and 0.5 mM EGTA. Indeed, it is known that the plasticity outcome correlates with the magnitude of dendritic calcium transients (Cormier et al., 2001) and can be predicted by the kinetic profile of these transients (Ismailov et al., 2004). In the same vein, the concentration of intracellular calcium buffer directly affects the LTD magnitude of NMDAR (Harney et al., 2006). Based on the findings of Harney et al., it is possible that the intracellular solution we used with patch clamp may not have been optimally adapted for LTD measurements; however, additional studies are needed to answer this question.

We conclude that LFS-induced LTD is not produced in hippocampus slices from rats older than 4 weeks in conventional experimental environments using patch-clamp technique. Nonetheless, our study provides an important and novel contribution because very little work, to our knowledge, has examined the influence of developmental factors on synaptic plasticity mechanisms studied with different electrophysiological techniques. These findings may have broader clinical implications given that many brain pathologies emerge at the end of adolescence. However, further experiments are needed to define those specific conditions that would improve the success of such recordings that will help to better understand the cellular effects of EtOH at a late stage of brain development.

FUNDING

This work was supported by the Université de Picardie Jules Verne, the INSERM organization, the Regional Council of Hauts de France, the European Community (FEDER funds), and the French Ministry of Research (MESRI), who financed the PhD positions of CB and CD. SP was supported by FEDER funds.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, Botia B, Pierrefiche O, Vilpoux C, Naassila M (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. Neuropharmacology 67:521–531.

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

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

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

Connor SA, Wang YT (2016) A place at the table: LTD as a mediator of memory genesis. Neuroscientist 22:359–371.

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

Crews FT, Robinson DL, Chandler LJ, Ehlers CL, Mulholland PJ, Pandey SC, Rodd ZA, Spear LP, Swartzwelder HS, Vetreno RP (2019) Mechanisms of persistent neurobiological changes following adolescent alcohol exposure: NADIA consortium findings. Alcohol Clin Exp Res 43:1806–1822.

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

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

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

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

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

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

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci USA 101:8174–8179. https://doi.org/10.1073/pnas.0402680101

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Luján R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. Eur J Neurosci 8:1488–1500.

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

Maurage P, Lannoy S, Mange J, Grynberg D, Beaunieux H, Banovic I, Gierski F, Naassila M (2020) What we talk about when we talk about binge drinking: towards an integrated conceptualization and evaluation. Alcohol Alcohol 55:468–479.

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

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

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

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

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

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

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

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

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 19:1–11.

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

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

Swartzwelder HS, Acheson SK, Miller KM, Sexton HG, Liu W, Crews FT, Risher ML (2015) Adolescent intermittent alcohol exposure: Deficits in object recognition memory and forebrain cholinergic markers. PLoS One 10:e0140042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140042

Swartzwelder HS, Park MH, Acheson S (2017) Adolescent ethanol exposure enhances NMDA receptor-mediated currents in hippocampal neurons: reversal by gabapentin. Sci Rep 7:13133. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12956-6

Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Morris RGM (2014) The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. Philos Trans R Soc B Biol Sci 369:20130288. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288

Theyel B (2018) Animal models in psychiatric disease: a circuit-search approach. Harv Rev Psychiatry 26:298–303.

Tozzi A, Durante V, Manca P, Di Mauro M, Blasi J, Grassi S, Calabresi P, Kawato S, Pettorossi VE (2019) Bidirectional synaptic plasticity is driven by sex neurosteroids targeting estrogen and androgen receptors in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Front Cell Neurosci 13:534. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00534

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

Article 2

Role of heat shock transcription factor 2 in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus.

Drissi I, Deschamps C, Alary R, Robert A, Dubreuil V, Le Mouël A, Mohammed M, Sabéran-Djoneidi D, Mezger V, Naassila M, Pierrefiche O.

La consommation d'éthanol perturbe l'apprentissage et la mémoire à travers l'altération de la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA dans l'hippocampe. Nous avons récemment démontré que deux épisodes de type *binge drinking* chez des rats jeunes adultes bloquent sélectivement la dépression à long terme (DLT) NMDA-dépendante dans des tranches d'hippocampe, augmentent la sensibilité des récepteurs NMDA à un antagoniste de la sous-unité GluN2B et induisent des déficits cognitifs. Ici, en utilisant des souris adultes *knockout*, nous montrons qu'un facteur de transcription sensible au stress de la famille des *heat shock*, HSF2, qui est impliqué dans la perturbation du développement cérébral induite par l'éthanol, participe à ces processus. En l'absence d'éthanol, les souris *hsf2*$^{-/-}$ montrent une perte sélective de DLT dans l'hippocampe, associée à une sensibilité accrue des PPSE-NMDA de champ à un antagoniste de GluN2B, par rapport aux souris sauvages (WT). Ces résultats suggèrent que HSF2 est nécessaire à une transmission synaptique glutamatergique correcte et à la plasticité de type DLT. Après un mois de consommation chronique d'éthanol dans un paradigme de choix entre deux bouteilles, les souris WT ont montré une transmission synaptique hippocampique augmentée, une sensibilité accrue à l'antagoniste GluN2B et un blocage de la DLT. En revanche, cette modulation de la transmission synaptique et de la plasticité n'était pas retrouvée chez les souris *hsf2*$^{-/-}$. Nous concluons que HSF2 est un médiateur important de la neurotransmission glutamatergique et de la plasticité synaptique dans des conditions basales et qu'il est également le médiateur des neuroadaptations induites par l'éthanol dans le réseau hippocampique suite à une consommation chronique d'éthanol.

Received: 6 November 2019 | Revised: 9 April 2020 | Accepted: 29 June 2020

DOI: 10.1111/adb.12939

ORIGINAL ARTICLE

Addiction Biology SSA WILEY

Role of heat shock transcription factor 2 in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus

Ichrak Drissi[1,2] | Chloé Deschamps[1] | Rachel Alary[1] | Alexandre Robert[1] | Véronique Dubreuil[3,4] | Anne Le Mouël[3,4] | Myriame Mohammed[3,4] | Délara Sabéran-Djoneidi[3,4] | Valérie Mezger[3,4] | Mickael Naassila[1] | Olivier Pierrefiche[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), Amiens, France

[2]Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK

[3]Université de Paris, UMR 7216 Epigenetics and Cell Fate, CNRS, Paris, France

[4]Département Hospitalo-Universitaire DHU PROTECT, Paris, France

Correspondence
Olivier 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, France.
Email: olivier.pierrefiche@u-picardie.fr

Present address
Ichrak Drissi, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, UK

Funding information
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Numbers: ANR-13-SAMA-0008-01, ANR-11-LABX-0071, ANR-18-IDEX-0001; Conseil régional Hauts-de-France; GRAP Laboratory; French Ministry of Education and Research

Abstract

Ethanol consumption impairs learning and memory through disturbances of NMDA-type glutamate receptor-dependent synaptic plasticity (long-term depression [LTD] and long-term potentiation [LTP]) in the hippocampus. Recently, we demonstrated that two ethanol binge-like episodes in young adult rats selectively blocked NMDA-LTD in hippocampal slices, increased NMDA receptor sensitivity to a GluN2B subunit antagonist, and induced cognitive deficits. Here, using knockout adult mice, we show that a stress-responsive transcription factor of the heat shock factor family, HSF2, which is involved in the perturbation of brain development induced by ethanol, participates in these processes. In the absence of ethanol, *hsf2*$^{-/-}$ mice show a selective loss of LTD in the hippocampus, which is associated with an increased sensitivity of NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) to a GluN2B antagonist, compared with wild-type (WT) mice. These results suggest that HSF2 is required for proper glutamatergic synaptic transmission and LTD plasticity. After 1 month of chronic ethanol consumption in a two-bottle choice paradigm, WT mice showed an increase in hippocampal synaptic transmission, an enhanced sensitivity to GluN2B antagonist, and a blockade of LTD. In contrast, such modulation of synaptic transmission and plasticity were absent in *hsf2*$^{-/-}$ mice. We conclude that HSF2 is an important mediator of both glutamatergic neurotransmission and synaptic plasticity in basal conditions and also mediates ethanol-induced neuroadaptations of the hippocampus network after chronic ethanol intake.

KEYWORDS

ethanol, GluN2A, GluN2B, heat shock factor, hippocampus, HSF2, NMDA, synaptic plasticity

1 | INTRODUCTION

Ethanol consumption impairs learning and memory through disturbances of NMDA-dependent forms of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), the synaptic plasticity signals related to memory processes in the hippocampus.[1–3] Learning impairment after ethanol may also occur in the hippocampus through AMPA-type glutamate receptors and α5-subunit GABA-A receptors. Cognitive deficits related to ethanol have been found in neonates and young and adult animals.[4–6] We recently demonstrated that two episodes of

 © 2020 Society for the Study of Addiction

ethanol intoxication in young adult rats selectively block NMDA-dependent LTD in hippocampus slices over several days and that such blockade was concomitant with learning impairment.[2] In addition, these effects were accompanied by a greater sensitivity of NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) to a GluN2B antagonist,[2,7] probably due to an increase in GluN2B subunit expression.[8] Thus, ethanol exposure induces functional adaptive changes in the hippocampus neuronal network leading to memory impairment. Such changes may involve different cellular targets such as ion channels or ligand-dependent receptors. Another possibility could be a long-term alteration in protein expression via the involvement of transcription factors such as cAMP response element binding (CREB).[9,10] At the cellular level, ethanol induces a stress response through the activation of the heat shock factor (HSF), a family of transcription factors[11–13] first described for their pivotal role in the cellular stress response to a large diversity of stimuli.[14] Under stress, HSFs induce the expression of heat shock proteins (HSPs), which are molecular chaperones that reestablish cell proteostasis. Besides their function in response to environmental insults, HSFs are also involved in various physiological and pathological contexts including gametogenesis, neurogenesis, cancers, neurodevelopmental and neurodegenerative disorders,[15–17] and brain responses to drugs of abuse.[12,18]

The involvement of HSPs in addiction might be due to their biological activities that are involved in neuroadaptation processes such as synaptic plasticity.[19] HSF1, the major regulator of HSPs, is known to interact with synaptic plasticity in the hippocampus and thus with learning and memory performance.[20] HSF1 establishes and maintains synaptic fidelity and function as well as memory consolidation through hippocampal plasticity.[20,21] Besides HSF1, other HSFs, like HSF2, have been shown to play an important role in brain development and adult brain integrity by controlling the expression of *Hsp* and non-*Hsp* gene targets.[12,17,22–24] In the prenatal brain, both HSF1 and HSF2 participate in the ethanol response by activating HSPs.[12,25] Indeed, the present authors demonstrated that fetal alcohol exposure induced the formation of ethanol-specific HSF1–HSF2 heterocomplexes, disturbing the binding of HSF2 to heat shock elements in genes that control neuronal migration. Interestingly, HSF2 is mainly expressed in hippocampal pyramidal neurons in contrast to glial cells that express both HSF1 and HSF2.[26] Furthermore, low doses of NMDA protect adult retinal ganglion cells from excitotoxicity through the induction of HSF1, HSF2, and HSP70.[27,28] In summary, both NMDA-dependent synaptic plasticity and HSF2 are modulated by ethanol exposure; however, it is unclear whether HSF2 is involved in ethanol-induced disturbances of synaptic plasticity in the hippocampus.

Here, we characterize synaptic activity in hippocampal slices of *Hsf2* knockout (KO) ($Hsf2^{-/-}$) mice and evaluate the alterations induced after 1 month of voluntary chronic ethanol intake. We found that HSF2 deficiency induces a selective impairment in hippocampal plasticity associated with abnormal sensitivities to GluN2A- and GluN2B-subunit antagonists. After chronic ethanol intake, $Hsf2^{-/-}$ mice did not show alteration of hippocampal synaptic transmission or plasticity as seen in wild-type (WT) animals, although the GluN2-subunit sensitivity to their antagonists was altered. We suggest that HSF2 participates in the modulation of the basal functioning of glutamatergic synapses, which in turn dictates both the capacity to perform synaptic plasticity and the neuronal adaptation of the hippocampus network in response to chronic ethanol intake.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Experiments were performed in conformity with the European Community Guiding Principles for the Care and Use of Animals (2010/63/UE) and the regional ethic committee (CREMEAP and CEEA-40). The invalidation strategy of the *Hsf2* gene has been described previously ($Hsf2^{tm1Mmr}$ mouse strain in a C57Bl/6N background; here after "$Hsf2^{-/-}$").[22] *Hsf2* WT and $Hsf2^{-/-}$ animals were produced by breeding *Hsf2* heterozygous mice. We studied adult female mice (90–-110 days) because they sensitized more easily to ethanol and consumed voluntarily more ethanol than males. Animals were individually housed in a controlled environment under a 12-h light/dark cycle with food and water available ad libitum.

2.2 | Voluntary ethanol consumption

Mice were tested in an open access two-bottle choice procedure (10% ethanol solution v/v vs. water) for 4 weeks. Alcohol intake (g of pure ethanol/kg body weight/day) and preference (percentage of ethanol intake to total fluid intake) were calculated. At the end of the procedure and before electrophysiology experiments, ethanol was replaced by water for 1 week in order to avoid ethanol withdrawal effects.

2.3 | Slices, electrophysiology, and analysis

After isoflurane anesthesia and decapitation, the brain was immersed in 4°C ACSF solution containing in mM: NaCl, 126; KCl, 2.5; NaH_2PO_4, 1.1; $NaHCO_3$, 18; $MgCl_2$, 1.4; $CaCl_2$, 0.5; ascorbic acid, 1; and glucose, 11 (300 mOsm, pH 7.2); 400-μm-thick dorsal hippocampus slice was obtained using a vibratome (Leica VT1200), stored 2 h in oxygenated ACSF (carbogen gas: 95% O_2, 5% CO_2,) of the following composition in mM: NaCl, 125; KCl, 3; NaH_2PO_4, 1.25; $CaCl_2$, 2.3; $MgCl_2$, 1.3; $NaHCO_3$, 25; and glucose, 10 (300 mOsm, pH 7.4), then transferred to a recording chamber superfused at a rate of 6 ml/min. The recorded slice is put on an agar ring in the middle of the perfusion chamber allowing oxygenation from both sides of the slice. A bipolar electric stimulating electrode (Phymep, Paris) was placed in Schaffer collaterals to evoke synaptic response. Recordings were made with 3-mM NaCl (1–3 MΩ) filled glass microelectrodes positioned in CA1 pyramidal cell body layer. LTD was induced with a 1-Hz train of 900 pulses (LFS900) and LTP with 2 × 50 Hz stimulations separated by 1 s. Magnitude of plasticity was determined

during the last 10 min of recording. To determine the response parameters for each slice, input/output (I/O) curve was performed until the maximum response was obtained. Test intensity was set at 50% of this maximum. fEPSP slope was plotted versus presynaptic fiber volley amplitude with GraphPad prism (Inc. CA, USA). Paired pulse facilitation (PPF) during baseline recording consisted in a double stimulation at test intensity with an interpulse interval of 50, 100, 200, and 300 ms. The ratio of the second over the first pulse was calculated. All results are expressed as percent of baseline value. For NMDA-fEPSPs analysis, the recording electrode was placed into the stratum radiatum and the bathing solution contained 0.1 mM Mg^{2+}, 50-μM bicuculline methiodide, a $GABA_A$ antagonist, and 10-μM 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX), an AMPA/Kainate antagonist. At the end of recording, 20-μM DL-2-amino-5-phosphonopentanoic (APV), an NMDA antagonist, was tested. The GluN2A- and GluN2B-subunit involvements were assessed using 20-nM NVP AAM077 and 10-μM RO 25-6981 as selective GluN2A and GluN2B antagonists, respectively. All synaptic responses were recorded at similar afferent volley amplitude. Signals were amplified (Grass amplifier, ×1000–2000), filtered (1–3 kHz), and acquired on computer (Signal software, CED, Cambridge, UK). Measurements were averaged every minute. In the text, *n* is the number of slices tested, and N is the number of animal used.

2.4 | Quantitative RT-qPCR

CA1 regions were dissected and snap-frozen (*N* = 11 WT; *N* = 9 *Hsf2*$^{-/-}$). RNAs were purified using Trizol protocol after tissue disruption in Precellys/Cryolys apparatus (Ozyme). Reverse transcription was performed using Luna Script RT SuperMix Kit (Biolabs). Quantitative PCR was performed in well plates on the Light Cycler LC480 (Roche) using Luna Universal qPCR Master Mix (Biolabs). The primers used are given in Table S1. A denaturation step (1 min, 95°C) was followed by 40 cycles of amplification of 15 s at 95°C then 30 s at 64°C. Melting curves were done from 63°C to 95°C with continuous acquisition (5 per °C). Results were analyzed with qBase+ software. The best reference genes were identified among eight candidates using the geNorm algorithm. Oligonucleotides were purchased from Sigma-Aldrich. See Table S1 for the primer sequences.

2.5 | Western blot experiment

Isolated CA1 (*N* = 12 WT; *N* = 10 *Hsf2*$^{-/-}$ mice) were stored in nitrogen and homogenized in 1% SDS solution, sonicated (5 min), and boiled for 5 min. Twenty micrograms of protein lysats were separated on 8% SDS-PAGE. Total proteins were labeled by the Revert total protein stain (Li-cor) and imaged on Li-cor Odyssey imaging system. Immunoblot for GluN2a (Abclonal, ref A0924) and GluN2b (Sigma-Aldrich, ref 06-600) were detected by chemiluminescence on Li-cor Odyssey imaging system. Images were quantified using ImageJ software.

2.6 | Labeling of dendritic spines with DiI

Dendritic spine labeling followed previously reported methods.[29] Mice were anesthetized and perfused with 0.9% NaCl followed by 2% *para*-formaldehyde (PFA) in phosphate buffer. Brains were postfixed overnight in 2% PFA before coronal sections (70 μm) were prepared on a vibratome. Either DiI crystals (less than 80 μm) were spread on sections manually or using diolistic (tungsten particles were coated with DiI and delivered using a Gene Gun). DiI was allowed to diffuse 4 h at room temperature (RT), and sections were postfixed in 4% PFA for 30 min. Confocal images (Leica SP5 STED) were acquired with a 40× objective zoom ×3 and analyzed with Neurolucida software.

2.7 | In situ hybridization

Mice were anesthetized and perfused with 0.9% NaCl followed by 4% PFA in phosphate buffer and postfixed overnight in 4% PFA. Brains were sectioned on vibratome at 40 μm and sections stored at −20°C in ethylene glycol–glycerol–phosphate-buffered saline (PBS) solution (1:1:1). Sections were recovered in PBS, and in situ hybridization (ISH) was done according to standard protocol.[23] Images were acquired on Leica microscope.

2.8 | Statistics and data presentation

Data are presented as mean ± SEM except when absolute values are presented. Statistics analyses were performed on raw data using unpaired Student's *t* test for LTP and LTD magnitude, for the percentage of decrease of NMDA-fEPSPs slope, and for RT-qPCR. RM-ANOVA was used to compare PPF ratio. Averaged (60 sweeps for LTP; 30 for LTD) and superimposed raw signal taken before and after plasticity are shown on figures. $P < 0.05$ was chosen as significant. For RT-qPCR experiments, Western blot analyses, and measures of dendritic spine density using DiI staining, data are displayed as means ± standard deviation (SD). For RT-qPCR experiments, analyses, and measures of dendritic spine density, statistical significance was assessed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test from the R package, for two groups with paired values. *P* values below 0.05 are considered statistically significant. For measures of signal intensity in Western blot analyses, we used Student's *t* test.

3 | RESULTS

3.1 | Basal synaptic transmission and plasticity in CA1 area of HSF2-deficient mice

Ethanol triggers a heat shock response through HSF2 activation in neurons[12] and affects synaptic plasticity in the hippocampus. We therefore asked whether the HSF2 pathway could mediate synaptic activity and neuronal plasticity in basal conditions. We thus studied

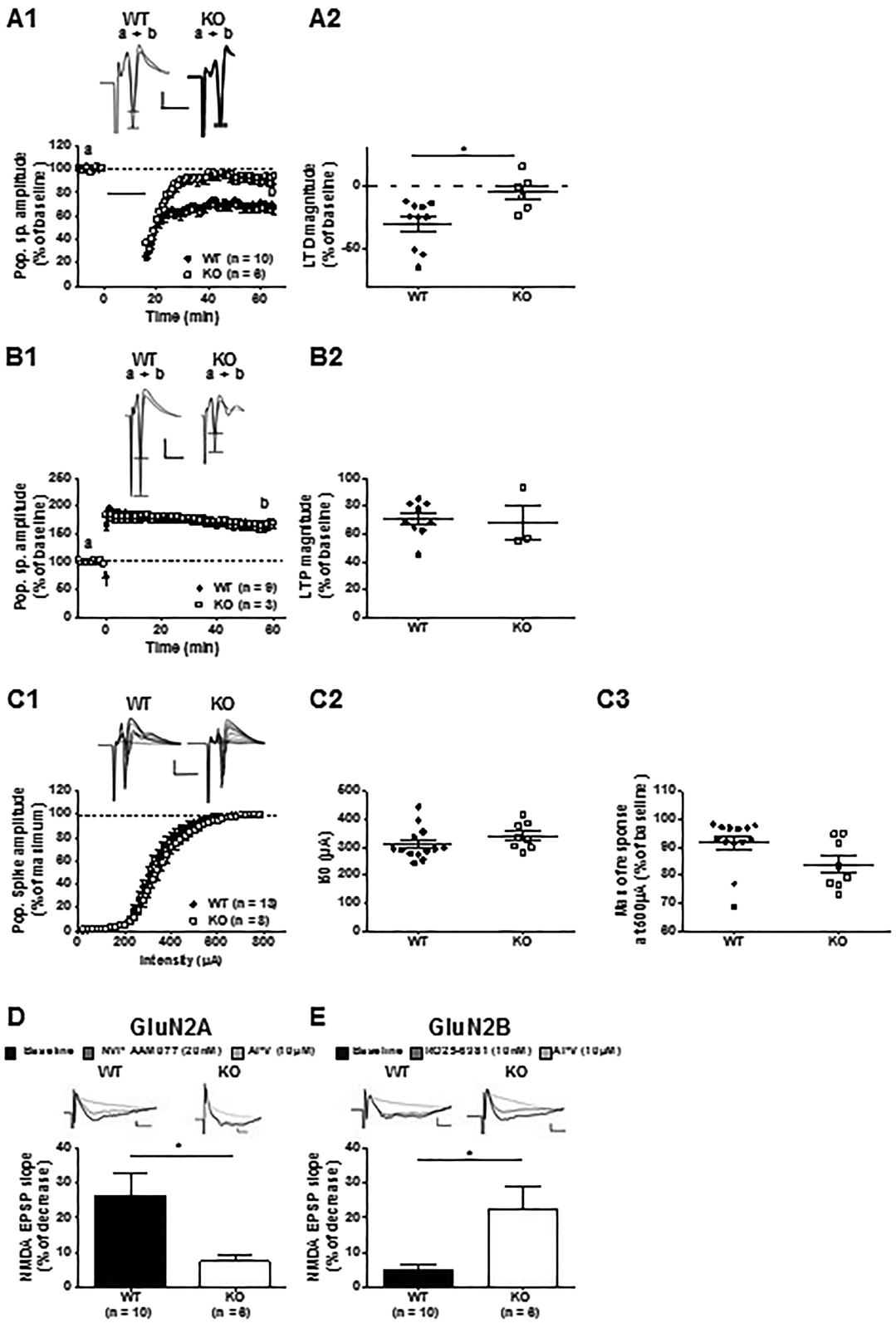


FIGURE 1 Synaptic transmission and plasticity in CA1 area of *hsf2*-deficient mice. (A1) HSF2-deficient mice had no long-term depression (LTD) compared with wild-type (WT) counterpart. (A2) Magnitude of LTD was significantly different between groups. (B1 and B2) In contrast, LTP magnitude was similar between populations. (C1) Input/output (I/O) curves in WT and *Hsf2*$^{-/-}$ mice were superimposed. (C2) Stimulation intensity at 50% of the response in the I/O curves was similar in WT and *Hsf2*$^{-/-}$ mice. (C3) The same maximal response in WT and *Hsf2*$^{-/-}$ mice was also obtained. (D and E) NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were more sensitive to GluN2B antagonist than GluN2A antagonist in WT mice, and this was the opposite in *Hsf2*$^{-/-}$ mice. Calibration bars are 0.2 mV and 10 ms for LTD recordings and 0.04 mV and 10 ms for EPSPs recordings

bidirectional plasticity (i.e., LTP and LTD) at the CA3-CA1 synapse in the hippocampus of *Hsf2*$^{-/-}$ mice and found that LTD was present in WT animals (−30.7 ± 6.0% of baseline values) but absent in *Hsf2*$^{-/-}$ mice (−5.9 ± 5.7% of baseline values; $P < 0.05$ compared with WT; Figure 1A1,A2). In contrast, LTP was unaltered in *Hsf2*$^{-/-}$ mice (Figure 1B1,B2) because it reached +70.5 ± 4.2% of baseline in WT mice and +68.5 ± 12.4% in *Hsf2*$^{-/-}$ mice ($P > 0.05$). To better understand how the disruption of the *Hsf2* gene induced a selective loss of LTD, we analyzed basal neurotransmission by assessing intrinsic excitability and neurotransmitter release. I/O curves performed in WT and in *Hsf2*$^{-/-}$ mice were superimposed (Figure 1C1) with no difference in the I50 values between populations (WT: 311.5 ± 16.0 μA vs. *Hsf2*$^{-/-}$: 341.2 ± 16.7 μA, $P > 0.05$ Figure 1C2) and in absolute values of the maximum response in the two populations (WT: 91.5 ± 2.4% vs. *Hsf2*$^{-/-}$: 83.8 ± 3.1%, $P > 0.05$; Figure 1C3). Furthermore, relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was mostly superimposed (Figure S1A1). Regarding PPF measurements, an indicator of neurotransmitter release, RM-ANOVA showed no difference between mice populations at any intervals tested, suggesting that the *Hsf2* gene KO had no effect on the mechanisms of presynaptic release (Figure S1A3). Furthermore, nor the estimated hippocampus volume and its cellular structure, as assessed by staining of the pyramidal neurons in CA1, of neurons in the dentate gyrus with ISH (*Cux2*, *Cadh8*, and *Otx1* markers), and of interneurons (*Reelin* labeling) were significantly altered in *Hsf2*$^{-/-}$ animals (Figure S1A). In addition, there was no significant change in dendritic spine density (DiI staining; Figure S1B).

We thus hypothesized that lack of LTD in *Hsf2*$^{-/-}$ mice arises from the disturbances of the basal properties of the glutamatergic synaptic transmission. For this, we tested if *Hsf2*$^{-/-}$ mice showed different pharmacological properties of NMDA-fEPSPs compared with WT animals by testing GluN2A and GluN2B subunit antagonists (Figure 1D,E). NVP AAM077, a GluN2A antagonist, reduced fEPSP slope by 26.4 ± 6.1% in WT animals and by 7.5 ± 2.0% in *Hsf2*$^{-/-}$ mice ($P < 0.05$). RO25-6981, an antagonist of the GluN2B subunit, reduced fEPSP slope by 5.2 ± 1.4% in WT animals and by 22.2 ± 6.8% in *Hsf2*$^{-/-}$ mice ($P < 0.05$). Thus, *Hsf2*$^{-/-}$ mice showed a lower GluN2A antagonist sensitivity and a higher GluN2B antagonist sensitivity than their WT counterparts (Figure 1D,E). In total, the absence of HSF2 had no effect on basal synaptic transmission, according to the parameters measured, in CA1 area of the hippocampus whereas LTD was selectively impaired, and NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists was the opposite to WT counterparts.

3.2 | Expression of the GluN1, GluN2A, and GlunN2B NMDA receptor subunits

To understand the molecular mechanisms that could underlie the impaired LTD and the different sensitivities to the GluN2A and GluN2B antagonists in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, we measured the expression of their mRNAs (*Grin2a* and *Grin2b*, respectively) and the level of their proteins in CA1. Indeed, NMDARs mainly exist as diheteromeric or triheteromeric receptors GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, or GluN1/GluN2A/GluN2B,[30] whose ratio of expression may impact the synaptic physiology.[8,31] Quantification of the *Grin1*, *Grin2a*, and *Grin2b* mRNA expression by RT-qPCR showed no difference between *Hsf2*$^{-/-}$ and WT mice (GluN1/*grin1*, ratio [WT/KO] 1.30; GluN2A/*grin2a* ratio 1.10; GluN2B/*grin2b* ratio 1.18; Figure S2A). Besides changes occurring at the subunit level of the NMDA receptor, the impaired synaptic properties in the *Hsf2*$^{-/-}$ mice could also be due to alteration of the NMDA-R pathway. We thus tested the expression of the immediate early genes (IEG) *Arc* and *Fos*, as a readout of this pathway and found a tendency to increased expression of *Arc* and *Fos* mRNA levels in *Hsf2*$^{-/-}$ CA1 region compared with *Hsf2*$^{+/+}$ animals (Arc ratio [WT/KO] 0.82, Fos 0.86), without statistical significance (Figure S2B).

3.3 | Voluntary chronic ethanol consumption

Follow-up of the consumption in our 1-month two-bottle choice paradigm showed that both groups of mice escalated their intake, although *Hsf2*$^{-/-}$ mice consumed relatively less ethanol than WT mice during the first 3 weeks of exposure. RM-ANOVA revealed an effect of genotype ($F_{(1,356)} = 8.44$, $P = 0.007$), an effect of time ($F_{(12,356)} = 11.8$, $P < 0.001$), and no interaction ($F_{(12,305)} = 1.55$, $P = 0.1$). Similarly, for ethanol preference, we found an effect of genotype ($F_{(1,356)} = 4.8$, $P = 0.04$), an effect of time ($F_{(12,356)} = 7.5$, $P < 0.001$), and no interaction ($F_{(12,305)} = 1.04$, $P = 0.4$). In both analyses, post hoc test showed no genotypic difference during the last three consecutive sessions during which there was no difference between populations in both the level of consumption (WT: 10.5 ± 0.86 g/kg/day vs. *Hsf2*$^{-/-}$: 8.8 ± 0.5 g/kg/day, $P > 0.05$; Figure 2A1,B1) and the preference for ethanol (WT: 59.1 ± 2.8 vs. *Hsf2*$^{-/-}$: 54.1 ± 2.8, $P > 0.05$; Figure 2A2,B2). The lack of difference at the end of ethanol exposure suggests that electrophysiology experiments, performed 8 days after the end of ethanol consumption, were conducted on animals that reached similar level of ethanol consumption.

3.4 | Synaptic transmission and plasticity in WT mice after chronic ethanol intake

In WT animals not exposed to ethanol, hippocampal LTD reached −30.7 ± 6.0% of baseline values. In contrast, after chronic ethanol intake, LTD was +3.2 ± 9.3% of baseline values ($P < 0.01$ between populations; Figure 3A1,A2). Similarly, LTP magnitude was decreased after chronic ethanol intake (WT: +70.51 ± 4.18% vs. WT EtOH: +37.07 ± 13.0%, $P < 0.01$; Figure 3B1,B2). As LTD blockade is a striking response to ethanol intake in WT animals, we further explored the origin of this selective impairment. We then analyzed the glutamatergic synaptic transmission in both control and ethanol-exposed WT animals. After chronic ethanol intake in WT mice, the I/O curve was shifted leftward (Figure 3C1). In consequence, the I50 value was

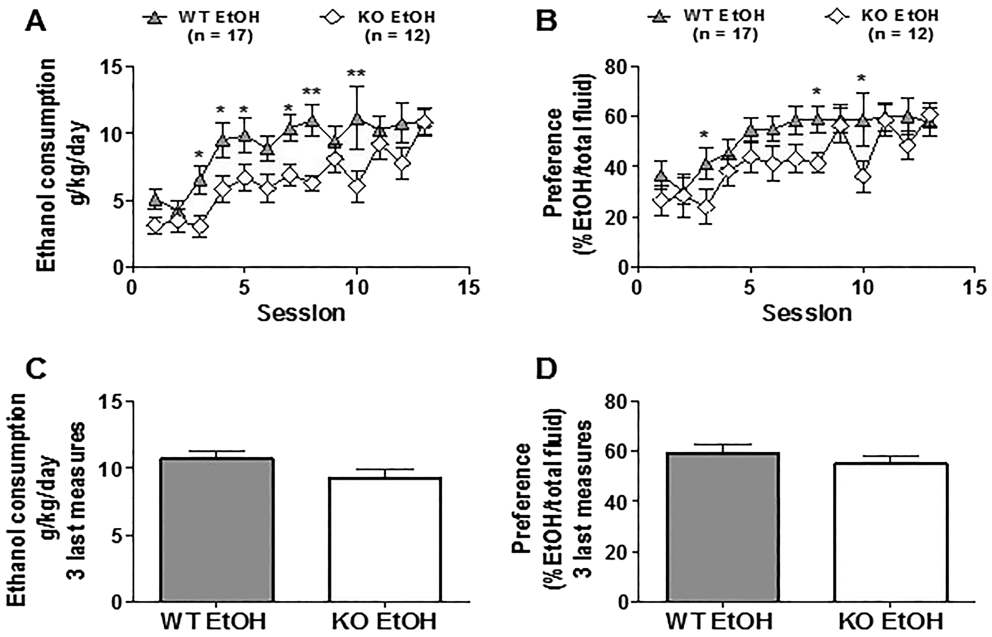


FIGURE 2 Ethanol consumption and preference. (A) Both animal genotypes showed increase in ethanol consumption along the procedure with a tendency to be lower in knockout (KO) animals. (B) The preference for ethanol was also slightly reduced in KO animals but followed the same time course than in wild-type (WT) animals. (C) There was no difference in ethanol consumption between the two genotypes during the last week of measurement. (D) Similar comments can be done regarding the preference for ethanol

lower in WT mice exposed to ethanol compared with control mice (WT: 311.5 ± 16.0 μA vs. WT EtOH: 211.5 ± 27.3 μA, $P < 0.05$; Figure 3C2). In addition, the maximum of response to stimulation was different in the ethanol-exposed animals (WT: 91.5 ± 2.4% vs. WT EtOH: 98.9 ± 0.7%, $P < 0.05$; Figure 3C3). Furthermore, the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was shifted leftward for most of the intensities tested in WT mice exposed to ethanol, revealing that afferent volley amplitude was higher after ethanol intake for almost any given stimulus intensity (Figure S3C1, C2). Finally, PPF (Figure S3C3) revealed no difference at any interval after ethanol intake in WT mice. In summary, the response of the hippocampal network to 1-month chronic ethanol intake in WT mice was (i) a decrease in LTP magnitude, (ii) a blockade of LTD, and (iii) an increase in intrinsic excitability whereas transmitter release probability was unaffected. To further understand how the hippocampal network adapted to chronic ethanol intake, we analyzed NMDA-fEPSPs sensitivity to antagonist of the GluN2A and GluN2B subunits. Without ethanol, NVP AAM077 reduced the slope of fEPSPs by 26.4 ± 6.1% (Figure 3D) whereas after ethanol intake, WT mice showed a reduced sensitivity to GluN2A antagonist (11.9 ± 3.9%, $P < 0.05$; Figure 3D). RO25-6981 reduced EPSP slope by 5.2 ± 1.4% without ethanol and by 23.8 ± 2.6% after ethanol intake, revealing an increase in sensitivity to GluN2B antagonist ($P < 0.05$ between groups, Figure 3E). Globally, chronic ethanol intake in WT mice was accompanied by an increase in the effect of GluN2B antagonist and a decrease in GluN2A antagonist efficiency.

3.5 | Synaptic transmission and plasticity in *Hsf2*$^{-/-}$ mice after chronic ethanol intake

We next analyzed *Hsf2*$^{-/-}$ mice exposed to ethanol in a similar procedure that the one used for WT mice. In basal conditions, *Hsf2*$^{-/-}$ mice constitutively showed an LTD impairment without alteration of LTP (Figure 1). We therefore wondered whether ethanol could nevertheless affect synaptic transmission and plasticity in these animals. Without ethanol, LTD was absent in *Hsf2*$^{-/-}$ mice (−5.9 ± 5.7%; Figure 1A1,A2), and ethanol consumption did not modify such impairment (−3.9 ± 5.7% of baseline values; $P > 0.05$ compared with *Hsf2*$^{-/-}$ mice without ethanol; Figure 4A1,A2). Similarly, ethanol intake did not change LTP magnitude which reached +68.5 ± 12.4% of baseline value in *Hsf2*$^{-/-}$ mice without ethanol and +51.5 ± 10.2% in ethanol-exposed *Hsf2*$^{-/-}$ mice ($P > 0.05$; Figure 4B1,B2). Furthermore, the I/O curve was similar after chronic ethanol intake compared with nonexposed animals, (Figure 4C1) with no difference in the I50 values (*Hsf2*$^{-/-}$: 341.3 ± 16.7 μA, vs. *Hsf2*$^{-/-}$ EtOH: 328.8 ± 29.5 μA, $P > 0.05$; Figure 4C2) and in the maximum of response (*Hsf2*$^{-/-}$: 83.8 ± 3.1% vs. *Hsf2*$^{-/-}$ EtOH: 90.2 ± 4.7%, $P > 0.05$; Figure 4C3). The relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity was also unaltered after ethanol consumption (-Figure S3B1,B2). PPF showed also no significant difference at any intervals between *Hsf2*$^{-/-}$ ethanol-exposed animals and those not exposed to ethanol (Figure S3B3). In summary, in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, there was no neuroadaptation of the hippocampal network after 1 month of chronic ethanol intake in terms of neuronal plasticity, intrinsic network excitability, and presynaptic release probability. Analysis of NMDA-fEPSPs in *Hsf2*$^{-/-}$ mice exposed to chronic ethanol intake however revealed a significant increase of the sensitivity to NVP AAM077 from 7.5 ± 2.0% to 29.4 ± 5.8% (Figure 4D; $P < 0.05$) whereas the sensitivity to RO25-6981 decreased from 22.2 ± 6.8% to 10.1 ± 2.8% (Figure 4E; $P > 0.05$). Thus, without ethanol exposure, *Hsf2*$^{-/-}$ mice showed a high sensitivity to GluN2B and a low sensitivity to GluN2A antagonists whereas the sensitivity of the two antagonists was reversed after ethanol intake.

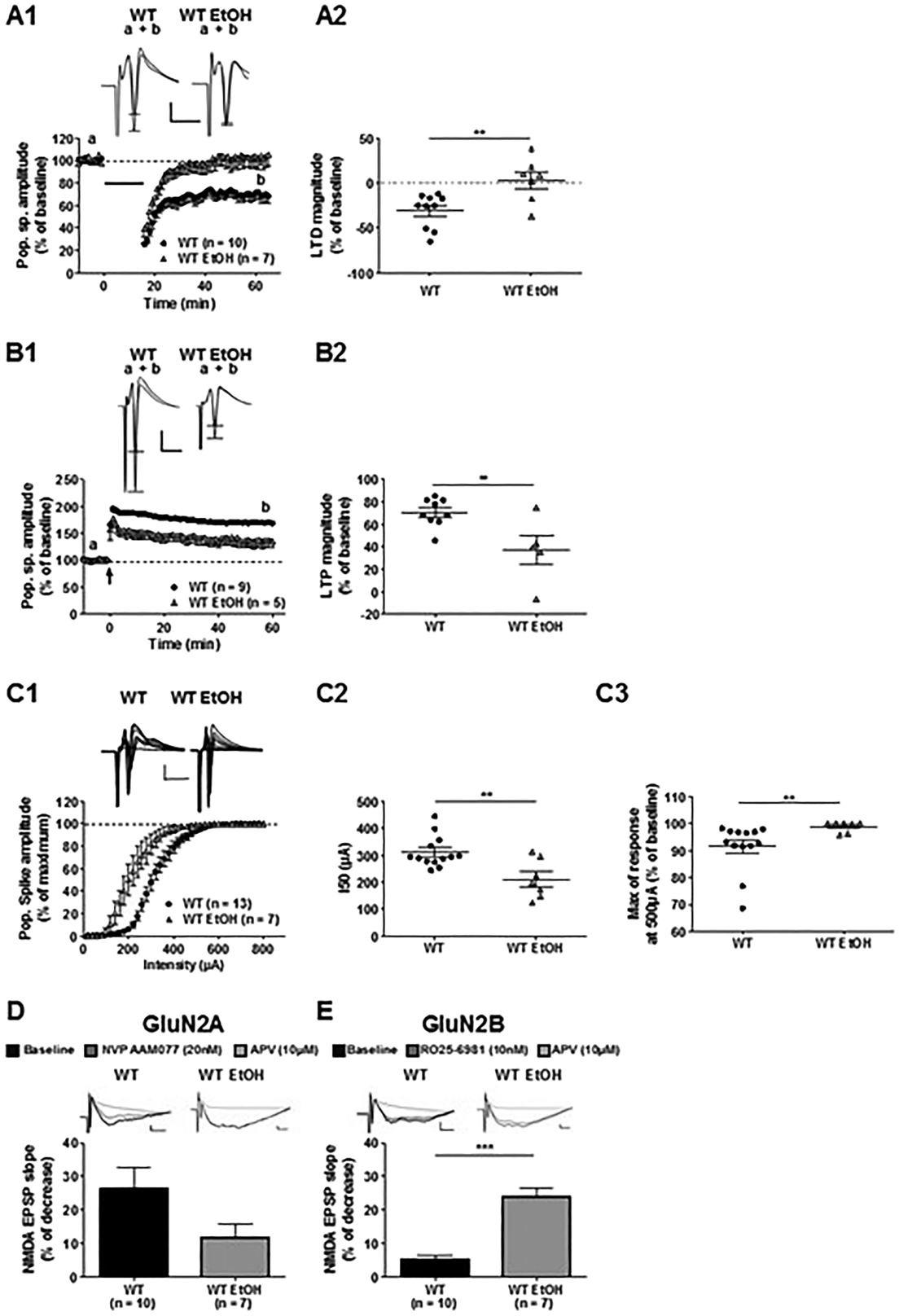


FIGURE 3 Ethanol exposure in wild-type (WT) animals. (A1 and A2) Long-term depression (LTD) was abolished after ethanol exposure. (B1 and B2) Magnitude of long-term potentiation (LTP) was significantly decreased after ethanol. (C1) Input/output (I/O) curves in WT animals was shifted leftward after ethanol. (C2) The I50 value was smaller after ethanol. (B3) The maximum response was significantly increased after ethanol. (D) NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) response to GluN2A antagonist was reduced after ethanol. (E) The response of fEPSPs to GluN2B antagonist was increased after ethanol. Calibration bars are 0.2 mV and 10 ms for LTD recordings and 0.04 mV and 10 ms for EPSPs recordings

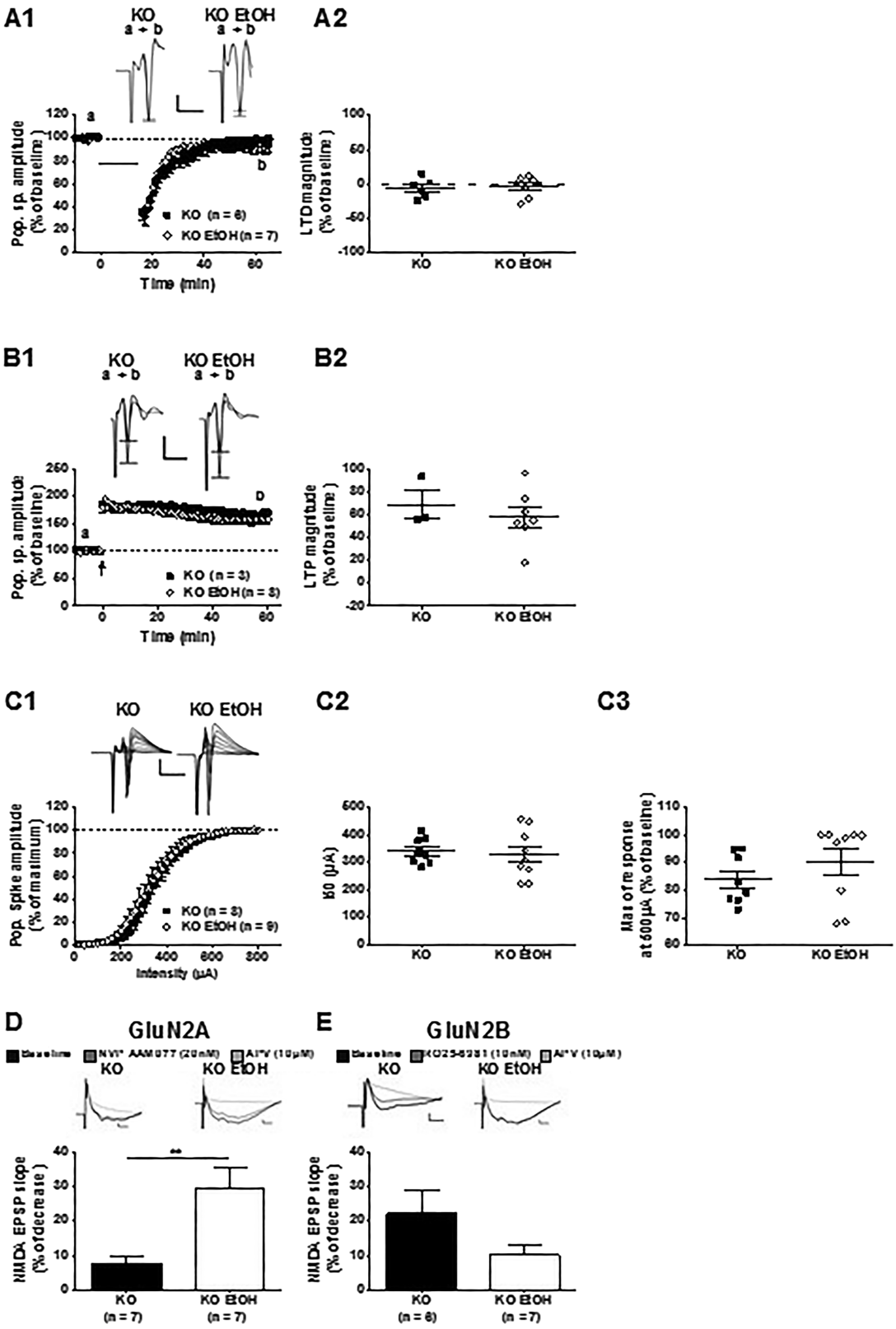


FIGURE 4 Ethanol exposure in *Hsf2*$^{-/-}$ mice. (A1 and A2) There was no effect of ethanol on the lack of long-term depression (LTD) observed in basal conditions. (B1 and B2) Long-term potentiation (LTP) was unaltered after ethanol. (C1) There was no effect of ethanol on input/output (I/O) curve. (C2) The I50 values from I/O curve was not changed after ethanol. (C3) The maximum amplitude of the signal was also not affected by ethanol exposure. (D) Responses to GluN2A antagonist on NMDA-field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) increased after ethanol. (E) In contrast, response to GluN2B antagonist was decreased. Calibration bars are 0.2 mV and 10 ms for LTD recordings and 0.04 mV and 10 ms for EPSPs recordings

4 | DISCUSSION

This study shows that *Hsf2*$^{-/-}$ mice display intrinsic, selective neuronal plasticity impairment in the hippocampus and an abnormally high sensitivity to a GluN2B-subunit antagonist. Voluntary ethanol consumption was not altered in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, but analysis of synaptic transmission and plasticity revealed a lack of neuroadaptations in these mice after chronic ethanol intake, whereas EPSPs pharmacological sensitivity was altered. These results are in contrast to those observed in the WT animals. The WT animals showed plasticity and glutamatergic transmission neuroadaptation after ethanol intake, including an EPSP pharmacological sensitivity that was opposite to that of the *Hsf2*$^{-/-}$ animals. In fact, chronic ethanol intake in WT animals led to a similar LTD blockade and to comparable alterations in NMDA-fEPSP pharmacological sensitivity as the *Hsf2* gene deletion without ethanol intake. The present experiments suggest that HSF2 participates in the modulation of basal functioning of glutamatergic synapses, which, in turn, dictates both the capacity for the LTD form of neuronal plasticity and the ethanol-dependent plasticity adaptation of the hippocampal network.

4.1 | *Hsf2*$^{-/-}$ mice have normal synaptic transmission and no LTD in basal conditions

Hsf2$^{-/-}$ mice had no NMDA-dependent LTD in the CA1 area of the hippocampus in basal conditions whereas LTP was unaltered. This selective functional effect of the *Hsf2* gene expression KO was not accompanied by any alteration in hippocampus volume, size, and dendritic spine density, suggesting that the lack of HSF2 does not per se induce major structural defects on the development of the hippocampus, which would have precluded any functional investigation in adults. However, during slice preparation, we observed that dorsal hippocampi were smaller in *Hsf2*$^{-/-}$ than in *Hsf2*$^{+/+}$ animals. This could be due to the experimental conditions including transportation or maladaptation to a change of animal house. Also, we measured a tendency for Arc and Fos mRNA levels to increase in Hsf2$^{-/-}$ mice in basal conditions that could reveal a higher vulnerability to neurodegeneration. However, this latter option is unlikely to alter selectively one type of plasticity, that is, LTD. Indeed, the lack of LTD was not accompanied by changes affecting basal synaptic transmission or presynaptic release probability because none of the other indices (I/O curves, relationship between afferent volley amplitude and EPSP slope, and PPF) were altered in *Hsf2*$^{-/-}$ mice compared with WT animals. Furthermore, LTP was induced in a similar way between animal populations, suggesting that both presynaptic and postsynaptic compartments in CA1 area were globally preserved in *Hsf2*$^{-/-}$ mice. In total, because there was no major structural defaults in the hippocampus in basal conditions, and because presynaptic release probability was unaltered in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, we postulate that the specific lack of LTD is of functional origin, possibly related to the postsynaptic compartment. This may include modifications in the receptor equipment of the membrane or in receptor function. In this context, analysis of NMDA-fEPSPs revealed a higher sensitivity to the GluN2A antagonist than the GluN2B antagonist in WT animals, but the opposite in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, suggesting an imbalance between the relative contributions of the activity of the two NMDA receptor subunits to NMDA-fEPSPs in *Hsf2*$^{-/-}$ mice in basal conditions. More precisely, the difference in sensitivity in WT animals could reflect, although indirectly, the higher proportion of NMDA receptors containing the GluN2A subunit in comparison with those containing the GluN2B subunit, a result commonly expected from mature glutamatergic synapses.[30] In *Hsf2*$^{-/-}$ mice, in which the opposite sensitivity to the antagonists was found, our results suggest a differential expression or functioning of the two NMDA receptor subunits compared with WT animals. However, we did not detect any difference of GluN2A and GluN2B subunit expression between *Hsf2*$^{-/-}$ and WT mice. Other possibilities to explain the difference in sensitivity to the GluN antagonists in *Hsf2*$^{-/-}$ mice could be an alteration in the NMDA receptor distribution between synaptic and perisynaptic/extrasynaptic sites, specifically receptors containing the GluN2B subunit, because this one is preferentially found at the latter site.[32] Indeed, HSF2 may indirectly influence the trafficking and/or the localization at the synapse of these subunits because it finely tunes the expression of genes controlling the dynamics of the microtubule network.[12] All these aspects would deserve further investigations. Finally, we tested the possibility that the lack of HSF2 affects downstream effectors of the NMDA receptor pathway, but the expression level of c-Fos and Arc mRNAs, two IEG that are modulated by the HSF pathway[33,34] was not significantly altered in *Hsf2*$^{-/-}$ mice. These results suggest that there is no overt neuron overexcitability in basal conditions in the CA1 area of *Hsf2*$^{-/-}$ mice, which could explain the phenotype of *Hsf2*$^{-/-}$ mice in terms of activity of the NMDA receptor pathway.

4.2 | Neuronal adaptations of the hippocampal network to chronic ethanol intake leads to LTD blockade

Another interesting result is the characterization of synaptic alterations occurring in WT animals after 1-month of chronic ethanol consumption. Concerning synaptic transmission, ethanol intake induced several changes in WT animals. The I/O curve was shifted leftward, meaning that for the same intensity of stimulation, the amplitude of the synaptic signal was stronger after ethanol. This effect suggests an increase in synaptic transmission, which is further supported by other measurements such as the lower intensity value needed to evoke 50% of the maximum response and the increased response recorded at the maximum intensity. The increased capacity of the network to respond to an input stimulation may be due to (i) an enhancement of glutamate release, (ii) a more effective presynaptic fiber recruitment, and/or (iii) changes in the postsynaptic compartment. We do not favor the first hypothesis because PPF measurements did not indicate any significant differences before

and after ethanol intake, a result that is in accordance with previous studies, including ours, performed in the hippocampus and following different procedures of ethanol exposure.[1,2,35] The second hypothesis is plausible because we measured a leftward shift of the relationship between afferent volley amplitude and EPSP slope in ethanol-exposed WT mice. The third suggestion is also likely because ethanol-induced up-regulation of GluN2B-containing NMDA receptor expression or function has been thoroughly reported in several studies,[36–38] and although such adaptations are often circuit and cell specific,[39] it is believed that this up-regulation reflects activity-dependent adaptive homeostatic plasticity. After ethanol, the blockade of NMDA-dependent LTD could be due to postsynaptic changes related to either the NMDA receptor itself or the postsynaptic environment modulating its activity,[40,41] which could then favor GluN2B-containing NMDA receptor activity.[2,8] Altogether, neuronal adaptation of the hippocampal network after chronic ethanol intake in WT animals is characterized by an increase in basal synaptic transmission likely due to enhanced presynaptic fiber recruitment and/or enhanced activity/expression of GluN2B-containing NMDA receptors, which eventually results in a selective blockade of NMDA-dependent LTD.

4.3 | Hippocampal network in *Hsf2*$^{-/-}$ mice does not adapt after chronic ethanol intake

Regarding the propensity of *Hsf2*$^{-/-}$ mice to drink ethanol, our results showed a slower escalation of drinking in these mice compared with WT mice and the same level of consumption and preference during the last week. This observation could indicate an initial differential sensitivity of the *Hsf2*$^{-/-}$ mice to the rewarding effect of ethanol and/or a slower development of tolerance. Because both genotypes escalated their intake and reached the same level of consumption at the end of exposure, it is unlikely that this difference may explain those observed with electrophysiology which was furthermore performed 1 week after the end of ethanol exposure. Without ethanol, *Hsf2*$^{-/-}$ mice showed not only a specific reduction in the ability to evoke NMDA-dependent LTD but also an abnormal high sensitivity to an antagonist of the GluN2B subunit. Interestingly and in contrast to WT animals, ethanol exposure in *Hsf2*$^{-/-}$ mice triggered (i) no modulation of LTD, (ii) no decrease of LTP, and (iii) no changes in glutamatergic transmission but (iv) a modulation in sensitivity to the GluN2 antagonists that was opposite to the one occurring in WT mice. Interestingly, the results obtained in *Hsf2*$^{-/-}$ mice in basal conditions in terms of inverted pharmacological sensitivity to GluN2 antagonists and of loss of LTD seem to phenocopy what happens in WT mice after ethanol consumption. Such observation may suggest that HSF2 protein is decreased in *Hsf2*$^{+/+}$ animals upon alcohol consumption. However, this is unlikely because we showed previously that ethanol exposure increased HSF2 levels.[12,42] Another possibility could be that ethanol consumption induced HSF2-independent and yet unknown mechanisms responsible for the restoration of a normal pharmacological sensitivity of NMDA-fEPSPs. Nonetheless, none of the electrophysiological features we observed after chronic ethanol intake in WT mice occurred in *Hsf2*$^{-/-}$ mice. The *Hsf2*$^{-/-}$ mice lacked LTD before ethanol intake; thus, it was unlikely that ethanol exposure could further impair this phenomenon. On the other hand, the changes in LTP magnitude and in synaptic transmission observed in WT mice after ethanol exposure were absent in *Hsf2*$^{-/-}$ mice, suggesting that HSF2 or its downstream pathway is required for such neuronal adaptation to chronic ethanol intake. Therefore, we may assume the difference in the neuroadaptations to ethanol between *Hsf2*$^{-/-}$ mice, and WT counterparts might be caused by the lack of HSF2 protein. HSF2 detects alcohol stress in fetal brain and mediates neuronal migration defects associated with fetal alcohol spectrum disorder in mice[12] through atypical ethanol-specific HSF1–HSF2 heterocomplexes, which disturb the binding of HSF2 to heat shock elements in genes that control neuronal migration. HSF2 modulates the HSF1-mediated expression of major *hsp* genes, revealing that HSF2 participates in the transcriptional regulation of the heat shock response.[12,43] NMDA receptors have a neuroprotective effect in retinal ganglion cells through time-dependent induction of HSF1 and HSF2 expression.[28] In the present study, the interplay between the two major HSFs was lacking in *Hsf2*$^{-/-}$ mice suggesting that these mice could not display the expected heat shock response. HSPs are major endogenous markers of cell stress and injury with various cellular functions. Ethanol exposure (either acute or chronic) increases HSPs expression, notably hsp70 in a rat model of ethanol-induced liver injury,[44] in the offspring brain following maternal ethanol consumption,[45] and in adult rat brain.[46,47] Several studies have demonstrated a neuroprotective role of increased hsp70 in different models of pathology affecting the hippocampus by protecting LTP.[48–50] In contrast, if hsp70 gene expression is down-regulated or the HSF2 protein is lacking or its action is blocked, cells are less likely to survive stressful events.[51] Taken together, this suggests that HSF2 participates in the response to ethanol with an important role in protecting cellular integrity including synaptic plasticity capabilities. Therefore, it is not surprising that the lack of HSF2 protein in the present study is accompanied with deficits in some forms of neuronal plasticity.

4.4 | Changes in NMDA-fEPSPs sensitivity to GluN2A and GluN2B antagonists

Interestingly, all experimentally induced disturbances in the present study were accompanied by alterations in pharmacological sensitivity of NMDA-fEPSPs to both GluN2A and GluN2B antagonists. First, compared with WT animals, *Hsf2*$^{-/-}$ mice lacked LTD but displayed increased sensitivity to the GluN2B antagonist and decreased sensitivity to the GluN2A antagonist. Second, in the WT animals, chronic ethanol intake induced a blockade of LTD accompanied by an increase in GluN2B-antagonist sensitivity and a decreased sensitivity to GluN2A antagonist. Thus, it could be suggested that neuronal plasticity is disturbed after ethanol exposure because changes in NMDA-

fEPSPs pharmacological properties occurred. In accordance with this notion, we previously demonstrated that in case of a high sensitivity of NMDA-fEPSPs to a GluN2B antagonist, NMDA-dependent LTD is effectively blocked in the hippocampus.[2,8] However, chronic ethanol exposure in *Hsf2*$^{-/-}$ mice increased the sensitivity to GluN2A antagonist and reduced that of GluN2B antagonist, therefore resembling the WT pharmacological profile without ethanol, although notably, LTD was still absent. In contrast, the NMDA-fEPSPs pharmacological profile of WT mice exposed to ethanol was similar to that of *Hsf2*$^{-/-}$ mice not exposed to ethanol whereas LTD was blocked in WT mice after ethanol exposure. All these results suggest a strong link between the pharmacological properties of the NMDA-fEPSPs and both the basal synaptic transmission and the capacity to perform plasticity; however, because LTD remained absent in *Hsf2*$^{-/-}$ mice exposed to ethanol, despite changes in NMDA-fEPSPs sensitivity to the antagonists that matched that of WT animals, other ethanol-induced mechanisms may occur to disturb synaptic plasticity. Globally, using *Hsf2*$^{-/-}$ mice we demonstrated that the network adaptive response to chronic ethanol intake depends on the level of involvement of GluN2A and GluN2B subunits. However, we could not establish a link between the HSF2 protein and the expression of these subunits suggesting that the effect of HSF2 operates neither by transcriptional nor by posttranslational effects.

In conclusion, the current study revealed an unanticipated role of HSF2, a stress- and alcohol-responsive transcription factor, in hippocampal glutamatergic neurotransmission and plasticity, under basal conditions and in ethanol-induced neuroadaptation of the hippocampal circuitry. The results suggest that HSF2 acts possibly through the regulation of IEG.

ACKNOWLEDGEMENTS

The GRAP Laboratory would like to thank the animal facility "PlatAnn" and their collaborators of University Picardie Jules Verne for taking care of the animals and for their help in the management of behavioral experiments and also Isabelle Le Parco and the staff from the Buffon animal housing facility at the Jacques Monod Institute (Paris Diderot University, Paris, France). We thank Aurélie Emery and Naomie Guille from VM Laboratory for histological analyses and Renaud Massart and Jorge Diaz (CNP, Sainte Anne Hospital, Paris) for their help in spine analyses.

I.D. had an INSERM PhD fellowship, C.D. is funded by the French Ministry of Education and Research, R.A. was funded by the GRAP Laboratory, A.R. was funded by the Conseil régional Hauts-de-France as research engineer, and V.M. was funded by the Agence Nationale de la Recherche ("HSF-EPISAME," SAMENTA ANR-13-SAMA-0008-01). This study contributes to the Labex Who Am I? ANR-11-LABX-0071 and the Université de Paris IdEx ANR-18-IDEX-0001 funded by the French Government through its "Investments for the Future" program.

AUTHORS CONTRIBUTION

ID performed all electrophysiology; CD performed behavioral experiments and some electrophysiology; RA performed some behavioral experiments; ID, CD, and RA analyzed all behavioral and electrophysiology experiments and built the figures; AR initiated this work with pilot experiments in electrophysiology; ALM, VD, DSD, MM, and VM provided the animals, conducted, performed, and analyzed RT-qPCR experiments, WB, and histological and in situ hybridization experiments; MN and OP designed and supervised the study and wrote and edited the manuscript. All authors have critically reviewed content and approved final version submitted for publication.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Mickael Naassila https://orcid.org/0000-0002-9788-0918
Olivier Pierrefiche https://orcid.org/0000-0003-1427-9332

REFERENCES

1. Kervern M, Silvestre de Ferron B, Alaux-Cantin S, et al. Aberrant NMDA-dependent LTD after perinatal ethanol exposure in young adult rat hippocampus. *Hippocampus*. 2015;25(8):912-923.
2. Silvestre de Ferron B, Bennouar KE, Kervern M, et al. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: Key role for GLUN2B subunit. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;19(1):1–11: pyv087.
3. Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem*. 2016;23(10):515-533.
4. Yang Y, Feng J, Xu F, Wang J. Piracetam inhibits ethanol (EtOH)-induced memory deficit by mediating multiple pathways. *Brain Res*. 1676;2017:83-90.
5. 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.
6. 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*. 2017;62:42-54.
7. Swartzwelder HS, Park MH, Acheson S. Adolescent ethanol exposure enhances NMDA receptor-mediated currents in hippocampal neurons: reversal by gabapentin. *Sci Rep*. 2017;7:1–7:13133.
8. Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, et al. Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/-GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addict Biol*. 2019;25:1–15:e12760.
9. Zhang Y, He F, Hua T, Sun Q. Green tea polyphenols ameliorate ethanol-induced spatial learning and memory impairments by enhancing hippocampus NMDAR1 expression and CREB activity in rats. *Neuroreport*. 2018;29(18):1564-1570.
10. Maynard ME, Barton EA, Robinson CR, Wooden JI, Leasure JL. Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder. *Brain Struct Funct*. 2018;223(1):195-210.
11. Tóth ME, Vígh L, Sántha M. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(3):299-309.
12. El Fatimy R, Miozzo F, Le Mouël A, et al. Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in

models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol Med*. 2014;6(8):1043-1061.
13. Hashimoto-Torii K, Torii M, Fujimoto M, et al. Roles of heat shock factor 1 in neuronal response to fetal environmental risks and its relevance to brain disorders. *Neuron*. 2014;82(3):560-572.
14. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):4-19.
15. Abane R, Mezger V. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J*. 2010;277(20):4150-4172.
16. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):545-555.
17. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Neef DW, et al. Abnormal degradation of the neuronal stress-protective transcription factor HSF1 in Huntington's disease. *Nat Commun*. 2017;8:1–17:14405.
18. Przewlocki R. Opioid abuse and brain gene expression. *Eur J Pharmacol*. 2004;150:331-349.
19. Hill SY. Neural plasticity, human genetics, and risk for alcohol dependence. *Int Rev Neurobiol*. 2010;91:53-94.
20. Hooper PL, Durham HD, Török Z, Hooper PL, Crul T, Vígh L. The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(5):745-753.
21. Uchida S, Hara K, Kobayashi A, et al. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:1681-1686.
22. Kallio M, Chang Y, Manuel M, et al. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J*. 2002;21(11):2591-2601.
23. Chang CC, Chen SD, Lin TK, et al. Heat shock protein 70 protects against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus via inhibition of nuclear factor-κB activation-induced nitric oxide synthase II expression. *Neurobiol Dis*. 2014;62:241-249.
24. Shinkawa T, Tan K, Fujimoto M, et al. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. *Mol Biol Cell*. 2011;22(19):3571-3583.
25. Ishii S, Torii M, Son AI, et al. Variations in brain defects result from cellular mosaicism in the activation of heat shock signalling. *Nat Commun*. 2017;8(1):1–15.
26. Marcuccilli CJ, Mathur SK, Morimoto RI, Miller RJ. Regulatory differences in the stress response of hippocampal neurons and glial cells after heat shock. *J Neurosci*. 1996;16(2):478-485.
27. Kwong JM, Lam TT, Caprioli J. Hyperthermic pre-conditioning protects retinal neurons from *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat. *Brain Res*. 2003;970(1-2):119-130.
28. 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(1):11-16.
29. Kroener S, Mulholland PJ, New NN, Gass JT, Becker HC, Chandler LJ. Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One*. 2012;7(5):e37541. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037541 (Epub 2012 May 30)
30. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):383-400.
31. Stroebel D, Casado M, Paoletti P. Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology. *Curr Opin Physiol*. 2018;2:1-12.
32. Groc L, Heine M, Cousins SL, et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(49):18769-18774.
33. Chen C, Xie Y, Stevenson MA, Auron PE, Calderwood SK. Heat shock factor 1 represses Ras-induced transcriptional activation of the *c-fos* gene. *J Biol Chem*. 1997;272(43):26803-26806.
34. Park AY, Park YS, So D, et al. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc/Arg3.1) is transiently expressed after heat shock stress and suppresses heat shock factor 1. *Sci Rep*. 2019;9:1–13.
35. Krahl SE, Berman RF, Hannigan JH. Electrophysiology of hippocampal CA1 neurons after prenatal ethanol exposure. *Alcohol*. 1999;17(2):125-131.
36. Cozzoli DK, Courson J, Wroten MG, et al. Binge alcohol drinking by mice requires intact group 1 metabotropic glutamate receptor signaling within the central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(2):435-444.
37. Lee KM, Coelho MA, McGregor HA, Solton NR, Cohen M, Szumlinski 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;10:1–14.
38. den Hartog CR, Gilstrap M, Eaton B, et al. Effects of repeated ethanol exposures on NMDA receptor expression and locomotor sensitization in mice expressing ethanol resistant NMDA receptors. *Front Neurosci*. 2017;11:1–12.
39. Burnett EJ, Chandler LJ, Trantham-Davidson H. Glutamatergic plasticity and alcohol dependence-induced alterations in reward, affect and cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;65:309-320.
40. Morisot N, Ron D. Alcohol-dependent molecular adaptations of the NMDA receptor system. *Genes Brain Behav*. 2017;16(1):139-148.
41. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, et al. Structure, function and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol*. 2018;150(8):1081-1105.
42. Miozzo F, Arnould H, de Thonel A, et al. Alcohol exposure promotes DNA methyltransferase DNMT3A upregulation through reactive oxygen species-dependent mechanisms. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(1):115-126.
43. 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(10):7077-7086.
44. Nanji AA, Griniuviene B, Yacoub LK, Sadrzadeh SM, Levitsky S, McCully JD. Heat-shock gene expression in alcoholic liver disease in the rat is related to the severity of liver injury and lipid peroxidation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995;210(1):12-19.
45. Holownia A, Ledig M, Copin JC, Tholey G. The effect of ethanol on HSP70 in cultured rat glial cells and in brain areas of rat pups exposed to ethanol in utero. *Neurochem Res*. 1995;20(7):875-878.
46. 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(3):391-397.
47. Calabrese V, Renis M, Calderone A, et al. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(7-8):1159-1167.
48. Kharlamov EA, Lepsveridze E, Meparishvili M, et al. 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(1-2):20-34.
49. Zare N, Motamedi F, Digaleh H, Khodagholi 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(2):309-319.
50. 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(6):732-742.

51. Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, et al. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science*. 2005;307(5708):421-423.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

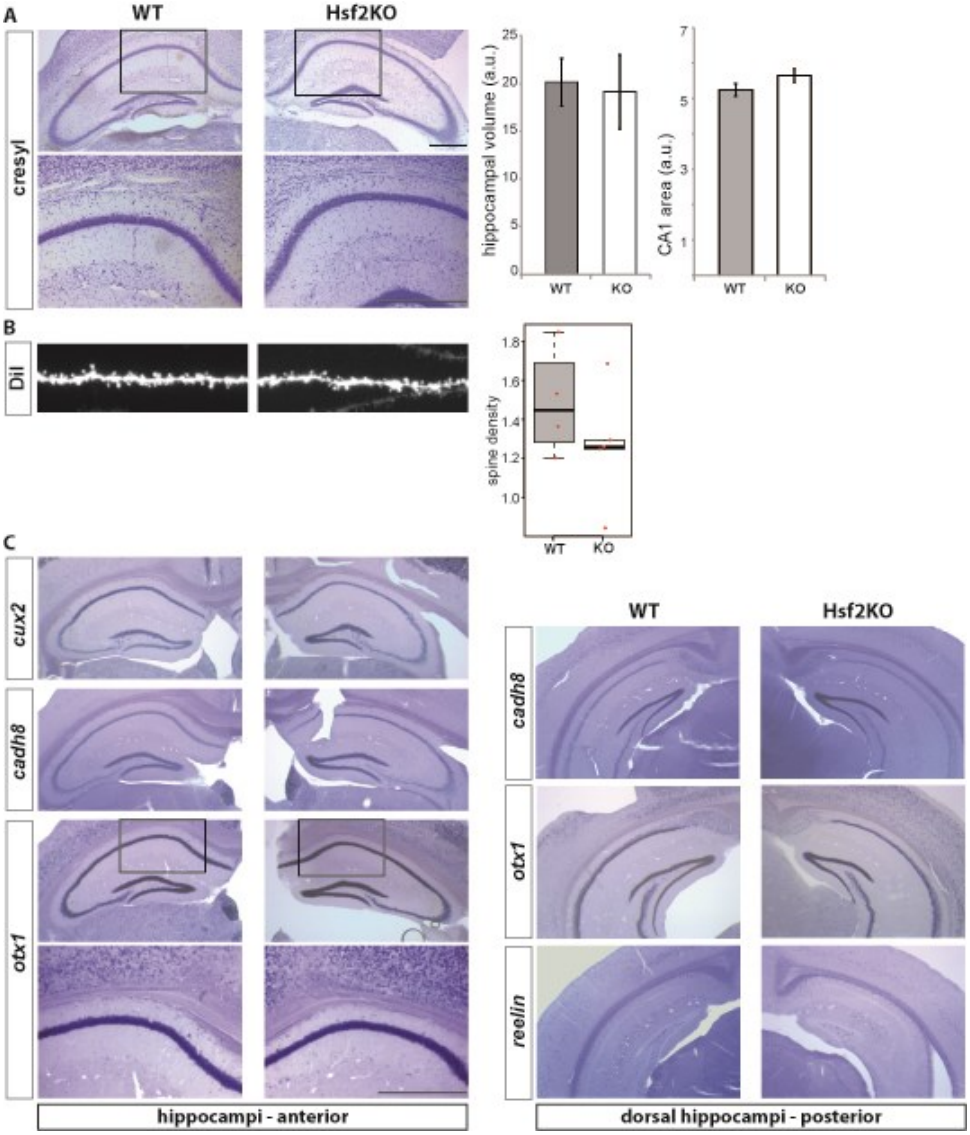
How to cite this article: Drissi I, Deschamps C, Alary R, et al. Role of heat shock transcription factor 2 in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus. *Addiction Biology*. 2021;26: e12939. https://doi.org/10.1111/adb.12939

Supplemental information for Manuscript entitled:

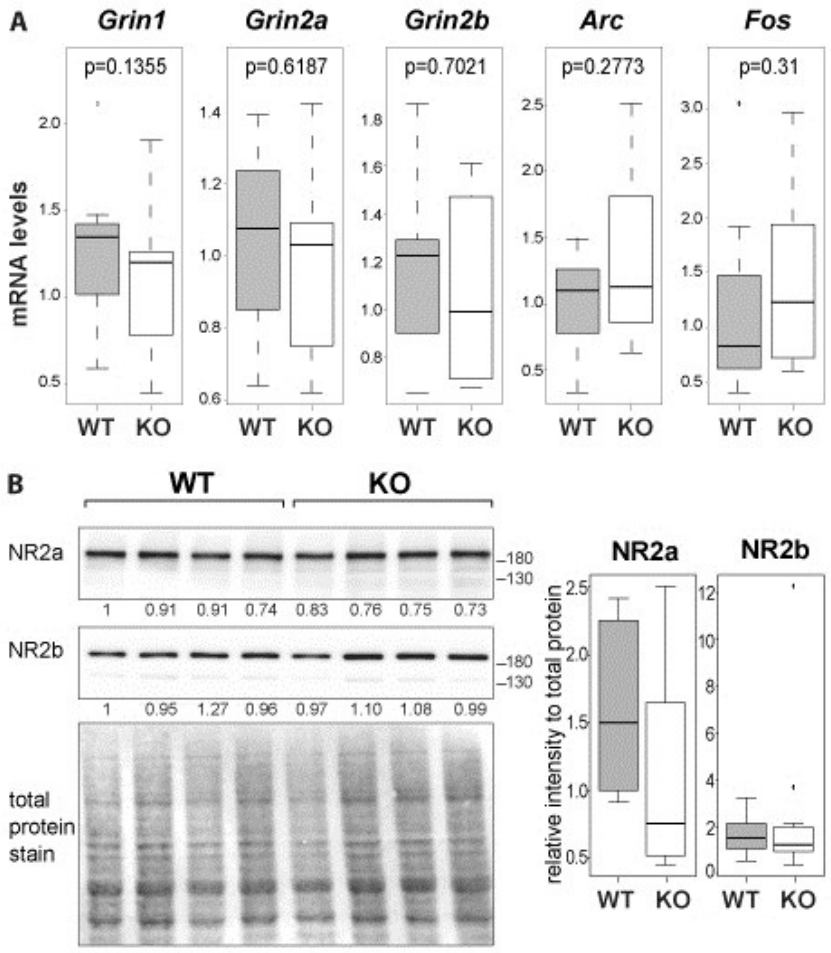
Role of Heat Shock Transcription Factor 2 (HSF2) in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus by Ichrak Drissi [1,2], Chloé Deschamps [1], Rachel Alary [1], Alexandre Robert [1], Véronique Dubreuil [3,4], Anne Le Mouël [3,4], Myriame Mohammed[3,4], Délara Sabéran-Djoneidi [3,4], Valérie Mezger [3,4], Mickael Naassila [1], Olivier Pierrefiche *[1]

Name	Forward	Reverse
Tpt1	**GTTGCTCTCCTGGACTACCGTG**	**GCAGCCAATTATGGTGACAGGT**
Hprt	**TGACACTGGTAAAACAATGCAAAC**	**AGGTCCTTTTCACCAGCAAGCT**
Hmbs	**TGCCACTCCACTGCCTACTT**	**TATGGAGGCCCCAAGGTGAG**
TBP	**TGCGTCAGGCGTTCGGTGGAT**	**ACGCGACCGCAGAAACCTAGC**
Grin1*	**CAAGTTTGGCACACAGGAGC**	**CAGGCCCTGGTACTTGAAGG**
Grin2a**	**CCCAAGGTCTGGAGGACAGC**	**CCCCGTACGTGTGGAGGAAA**
Grin2b	**AGCACGTGGACTTGACTGAC**	**TGCTTATCGCCTGTTCCGTG**
Arc***	**GACGCTGAGGAGGAGGAGAT**	**CGTCCTGCACTTCCATACCC**
Fos	**AGCAATTCCTTGGGGATGGG**	**GCTTGGGAAGGAGTCAGCTT**

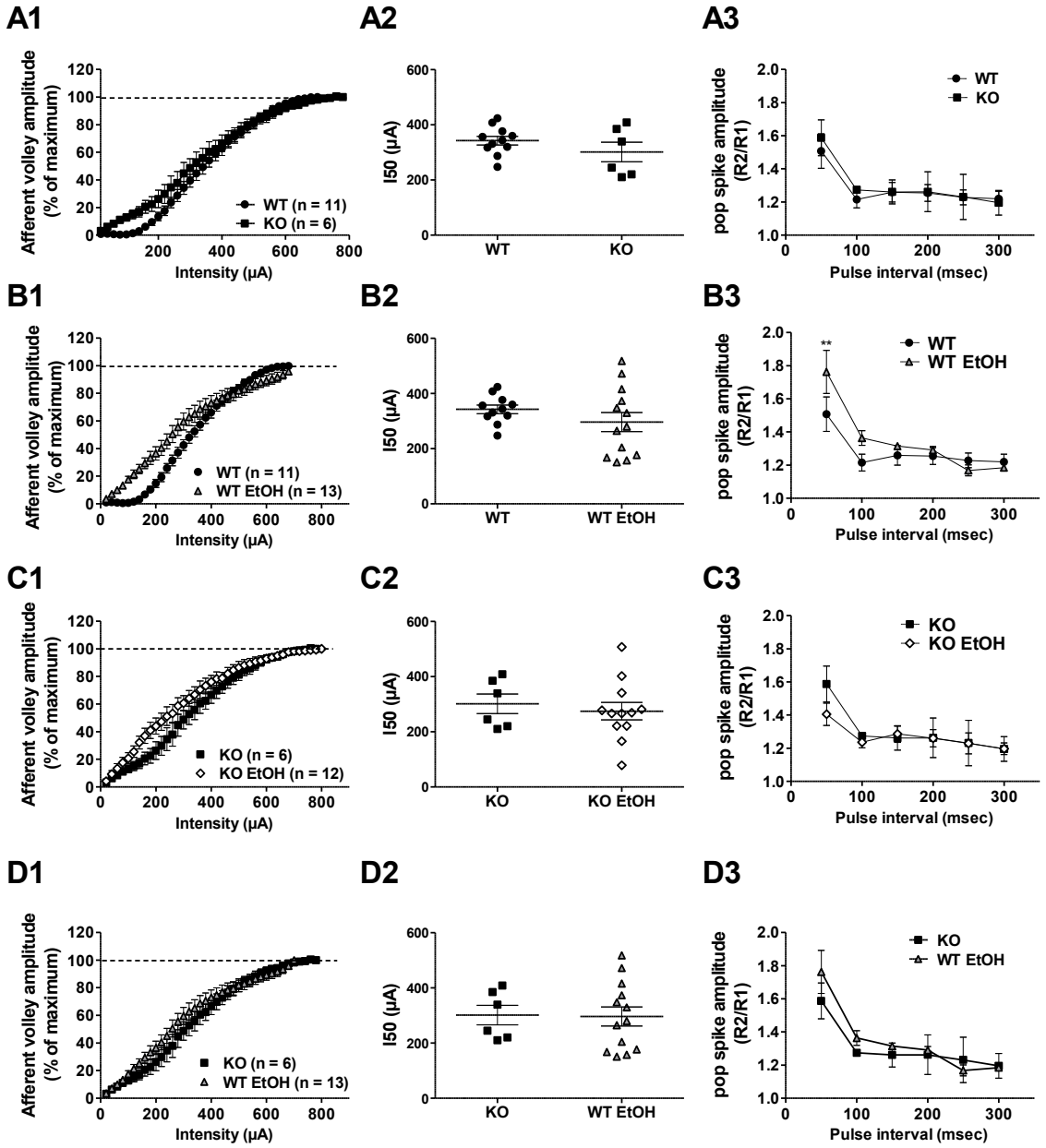
Suppl. Table 1: Primer sequences (5'-3'): *Grin1 primers amplify 3 isoforms, **Grin2b primers amplify 3 isoforms, ***Arc primers amplify 2 isoforms.



Suppl. Fig. 1. The inactivation of the *Hsf2* gene does not impact on the morphology, cellular organization and identity of the hippocampus. (A) Hippocampal morphology observed on cresyl violet ; stained coronal sections (50 µm) of adult WT and *Hsf2*$^{-/-}$ (Hsf2KO), compared to *Hsf2*$^{+/+}$ animals (Hsf2WT). Scale bar: 500 µm. Enlargement of the CA1 region is shown in the lower panels. Hippocampal volumes were estimated by summing the hippocampal areas at three coronal levels (anterior, medial and posterior). CA1 area was measured at the medial hippocampal level; n = 5-6 animals. Areas were measured with imageJ. (**B)** (left panels) CA1 dendritic spines labeled by DiI staining and observed by confocal imaging. (right panels) Quantification of the spine density of CA1 neurons, n = 3 animals of each genotype, 10 labeled dendritic segment/animal were analyzed. (**C)** *in situ* hybridization using probes for neuronal markers (pyramidal neuron marker *Cux2*, *Otx1* and *Cadh8*; interneuron marker *Reelin*), showing the preserved cellular identity and organization of the hippocampus in *Hsf2*$^{-/-}$ animals, compared to *Hsf2*$^{+/+}$; ISH was performed on 50 µm floating sections. The protocol is taken from reference 51.



Suppl. Fig. 2: Expression levels of immediate early genes and of NMDA receptor subunits in Hsf2$^{-/-}$ versus WT animals. (A) Quantitative RT-qPCR showing the mRNA levels of Grin2a, Grin2b, Grin1, Arc and Fos genes, in the CA1 region of WT and Hsf2$^{-/-}$ (KO) adult animals. (**B**) Top panels: immunoblot for the GluN2a and GluN2b NMDA receptor subunits. Bottom panel: total protein stain of the blot, used to normalize the relative quantification indicated above each lane. CA1 total protein lysats of four individuals of each genotype was analyzed.



Suppl Figure 3: CA1 synaptic transmission before and after ethanol exposure. (A1) The relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity in WT animals was shifted leftward after ethanol (WT 2BC). **(A2)** Paired-pulse facilitation in WT animals before and after ethanol showing the lack of effects of ethanol on presynaptic release probability. **(B1)** In contrast to WT animals, the relationship between afferent volley amplitude and stimulus intensity in hsf2$^{-/-}$ mice was not altered by ethanol. **(B2)** No change in paired-pulse facilitation in hsf2$^{-/-}$ mice after ethanol.

Article 3

Interstrain differences in voluntary binge-like drinking behavior and in two acute ethanol injections-induced synaptic plasticity deficits in rats.

Sauton P*, Deschamps C*, Jeanblanc V, Pierrefiche O, Jeanblanc J, Naassila M.

La propension à boire de l'alcool et à initier un comportement de *binge drinking* est déterminée par des facteurs génétiques. Récemment, nous avons proposé un modèle animal original utile pour l'étude de la consommation volontaire de type *binge drinking* (BD) chez des rats Long-Evans non consanguins en combinant un accès intermittent à l'éthanol 20% dans un paradigme de choix entre deux bouteilles (IA2BC) à des sessions quotidiennes de 15 minutes d'auto-administration opérante d'éthanol 20 %. Nous avons cherché à comparer trois souches de rats non consanguins (Long-Evans, Sprague-Dawley et Wistar) dans notre modèle de BD. Comme nous avons constaté une propension différente au BD entre les souches, nous avons également cherché à tester les différences entre souches en utilisant une autre procédure de deux expositions aiguës à l'éthanol connues pour modifier la plasticité synaptique de type DLT dans l'hippocampe. Nos résultats montrent que dans les procédures IA2BC et opérante, la souche Long-Evans a consommé la plus grande quantité d'éthanol, la souche Wistar la plus faible, et la souche Sprague-Dawley était intermédiaire. Les rats Long-Evans étaient également ceux qui consommaient le plus rapidement, avec le temps le plus court pour atteindre 50 % de leur consommation maximale en 15 minutes. Lorsque nous avons testé les effets aigus de l'éthanol, la DLT dans l'hippocampe était abolie spécifiquement chez les Long-Evans, alors qu'elle n'était pas impactée chez les deux autres souches. Ainsi, notre étude révèle que la souche Long-Evans est la souche idéale dans notre modèle animal récemment développé et utile pour l'étude du BD. De plus, avec l'autre paradigme d'exposition forcée et aigüe à l'éthanol, la souche Long-Evans présente une sensibilité accrue à l'effet délétère du BD sur la plasticité synaptique hippocampique. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer pourquoi les rats Long-Evans sont plus enclins au BD.

Received: 12 June 2020 | Revised: 10 November 2020 | Accepted: 11 November 2020

DOI: 10.1111/adb.12992

ORIGINAL ARTICLE

Addiction Biology SSA WILEY

Interstrain differences in voluntary binge-like drinking behavior and in two acute ethanol injections-induced synaptic plasticity deficits in rats

Pierre Sauton[1] | Chloé Deschamps[1] | Virginie Jeanblanc[2] | Olivier Pierrefiche[1] | Jérôme Jeanblanc[1] | Mickael Naassila[1]

[1]INSERM UMR 1247 – Research Group on Alcohol & Pharmacodependences (GRAP), Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

[2]Animal Facility PlatAnN, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

Correspondence
Mickael Naassila, INSERM UMR 1247 – GRAP, Université de Picardie Jules Verne, CURS, Chemin du Thil, 80025 Amiens cedex 1, France.
Email: mickael.naassila@u-picardie.fr

Funding information
French Ministry of Superior Education, Research and Innovation

Abstract

Propensity to drink alcohol and to initiate binge drinking behavior is driven by genetic factors. Recently, we proposed an original animal model useful in the study of voluntary binge-like drinking (BD) in outbred Long–Evans rats by combining intermittent access to 20% ethanol in a two-bottle choice (IA2BC) paradigm to 15-min daily sessions of 20% ethanol operant self-administration. We sought to compare three strains of outbred rats (Long–Evans, Sprague–Dawley, and Wistar) in our BD model. Because we found different propensity to BD between strains, we also sought to test interstrain differences using another procedure of two acute ethanol exposures known to alter long-term depression of hippocampal synaptic plasticity. Our results demonstrate that in both IA2BC and operant procedures, the Long–Evans strain consumed the highest, Wistar the lowest amount of ethanol, and the Sprague–Dawley was intermediate. Long–Evans rats were also the fastest consuming with the shortest time to reach 50% of their maximum consumption in 15 min. When we tested the acute effects of ethanol, long-term depression in hippocampus was abolished specifically in Long–Evans rats with no impact in the two other strains. Thus, our study reveals that the Long–Evans strain is the ideal strain in our recently developed animal model useful in the study of BD. In addition, with the other paradigm of forced acute ethanol exposure, the Long–Evans strain displayed an increase in sensitivity to the deleterious effect of BD on hippocampal synaptic plasticity. Further studies are needed in order to investigate why Long–Evans rats are more prone to BD.

KEYWORDS
binge drinking, rat strain, synaptic plasticity

1 | INTRODUCTION

Similar to humans, genetic background plays a critical role in propensity to drink alcohol in rodent models useful in the study of alcohol use disorder (AUD). Thus, the use of heterogeneous outbred rodents in constant controlled conditions seems to be advantageous for translatability into human AUD.[1] Significant differences have been shown among the three strains Long–Evans (LE), Sprague–Dawley (SD), and Wistar (W) using different concentrations of ethanol and forced or voluntary ethanol presentation procedures.[2] Although the three strains did not differ in sensitivity to ethanol-induced hypothermia

Pierre Sauton and Chloé Deschamps contributed equally to this work.

Olivier Pierrefiche, Jérôme Jeanblanc, and Mickael Naassila are last co-authors.

© 2020 Society for the Study of Addiction

and motor impairment, the LE strain consumed more ethanol than W and SD rats.[2] Previous studies showed that LE rats were highly susceptible to the effects of chronic ethanol exposure, both in terms of liver and brain injury. Thus, more severe ethanol-mediated liver disease and steatohepatitis have been demonstrated in alcohol-fed LE compared with SD rats.[3]

Difference in ethanol drinking could also be due to procedures of ethanol drinking and or exposure. In the inhalation procedure, one study tested 10 rat strains in a two-bottle choice procedure after a 4-week period of ethanol vapor exposure.[4] In this study, among the 10 strains, W and LE rats exhibited the highest degree of ethanol vapor-induced ethanol drinking reaching 8.1 and 5.2 g of pure ethanol per kilogram bodyweight per day, respectively.

In the procedure of intermittent access to 20% ethanol in two-bottle choice (IA2BC), first published in the early 1970s,[5,6] the presentation of the ethanol solutions to the animals on every other day leads to a gradual escalation of ethanol intake and preference. Most of the studies used LE and W rats, and some studies used SD rats.[7] However, the percentage of SD rats not showing drinking escalation seems to be higher in this strain compared with the LE and W strains.[8] Interstrain differences in ethanol drinking may come from strain differences in the fact of reaching pharmacologically relevant blood ethanol concentrations. In this regard, LE rats reach high blood ethanol concentrations with lower levels of ethanol intake compared with W, SD, and alcohol-preferring (P or Sardinian) rats.[9–11] Carnicella et al[7] suggested that the LE strain might be the ideal outbred strain for the IA2BC procedure. In addition, they also suggested that important differences in ethanol drinking behavior can be due not only to interstrain differences but also to interlaboratory and intersupplier variability.[7] Palm et al[12] reported twofold differences in ethanol intake in a three-bottle choice procedure (water, 5% and 20% ethanol) among W rats from five different suppliers, and rats from all strains showed very little or no escalation in ethanol intake over time.

Recently, we proposed an original rat model useful in the study of ethanol binge-like drinking (BD) with good face validity and predictive validity.[13–15] We proposed several criteria for an ideal preclinical model useful in the study of BD behavior.[16,17] In this model, we combined 4 weeks of IA2BC procedure to several weeks of 15-min daily session of 20% ethanol-operant self-administration.[14] Because numerous alcohol studies have shown large interstrain differences and because other laboratories could be interested in our model using other strains of rats, we investigated the effect of the rat strain using LE, SD, and W strains.

Because we observed large interstrain differences in voluntary BD behavior, we sought to investigate whether interstrain differences may also exist regarding the consequence of acute BD on synaptic plasticity in hippocampus, in rats with no history of chronic ethanol BD. We chose to focus on hippocampus because animal and human studies have repeatedly shown that hippocampus is particularly vulnerable to BD-induced both morphological and functional alterations in adolescents and young adults.[18] Insults to the hippocampus have pervasive implications for the brain more broadly, and for key cognitive and emotional processes, impairment in these processes may further exacerbate psychopathology and could contribute to the persistence of BD behavior and the development of AUD.[19] There is large evidence for the involvement of hippocampus-dependent learning and memory as well as hippocampal plasticity in development and maintenance of addiction.[20] We focused on long-term depression (LTD) of synaptic activity because we previously showed[21,22] that LTD is impaired 48 h after a BD exposure in adolescent SD rats and it seems that LTD may be the form of synaptic plasticity that could be particularly sensitive to the effects of BD exposure. To our knowledge, no work has yet studied the effect of the strain on hippocampal synaptic plasticity before or after exposure to ethanol. It is noteworthy that our goal was not to examine interstrain differences in the effect of voluntary BD on hippocampal synaptic plasticity or the role of hippocampal synaptic plasticity in the propensity to BD behavior. Our goal was to focus on interstrain differences in two aspects of BD with the propensity to BD behavior and the consequences of acute BD exposure.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics and study approval

Experiments were carried out in accordance to the guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health [NIH]) and the E.C. regulations for animal use in research (CEE no. 86/609) and were approved by the local research ethics committee (CREMEAP; no. APAFIS#2145-201510051547534). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2 | Drugs

Ethanol (95%, v/v) was purchased from VWR International (France) and diluted in tap water to a final concentration of 20% (v/v).

2.3 | Animals

2.3.1 | Behavioral experiments

Males LE (*N* = 30; Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France), SD (*N* = 10; Charles River, Saint-Germain-Nuelles, France), and W (*N* = 30; Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France) rats were used. The rats arrived at the age of 7 weeks and were individually housed with no enrichment in their isolated ventilated cages (IVC) home cage and in a 12/12 light/dark phase with the dark one starting at 7:00 p.m. Food and water were provided ad libitum. The experiments started 1 week after their arrival. At the end of behavioral experiments, animals were 12–14 weeks old.

2.3.2 | Electrophysiology

Naïve LE (*N* = 9), SD (*N* = 7), and W (*N* = 6) rats from the same origins were housed in the exact same conditions and used at the age of 14 weeks.

A time line of the experiments and treatments is presented on Figure 1.

2.4 | Intermittent access to 20% ethanol in two-bottle choice

Rats were submitted to a 20% intermittent access paradigm to induce an escalation in ethanol consumption for 4 weeks as described previously.[6,7,10,14] Before the operant BD procedure, nine sessions of the IA2BC paradigm were carried out in order to develop ethanol palatability and to facilitate escalation in ethanol intake. Thus, the same rats underwent the IA2BC followed by the self-administration procedure. Rats had access to two bottles, one containing tap water and one containing a 20% ethanol solution (v/v) every other day in their home cage. Bottles were placed at 2:00 p.m. and removed at the same time the next day. Bottles were weighted at the end of each drinking session and the rats twice a week.

2.5 | 20% ethanol-operant self-administration

Rats were trained as described[14] (see the Supporting Information for details). Briefly, rats were submitted to successive schedules of reinforcement from fixed ratio 1 (FR1) during two overnights, FR1 1 h for five to seven sessions, FR3 1 h, FR3 30 min, and finally, FR3 15 min. Due to different speeds in learning the task and to reach stable baseline of self-administration between strains, and to ease comparison between the levels of consumption reached by schedule, only the four to five last stable sessions for each schedule are depicted in the results.

2.6 | Binge-like ethanol exposure for electrophysiology

As we previously described,[21,22] animals from the ethanol group received two intraperitoneal injections of ethanol (ethanol 20% v/v, 3 g/kg), 9 h apart, and control group received two intraperitoneal injections of 0.9% NaCl. All recordings were performed 48 h after the first injection.

2.7 | Blood ethanol concentration determination

Because we observed large differences in the propensity to drink ethanol during the first drinking sessions, we sought to evaluate if it was linked to differences in ethanol metabolism before the development of ethanol tolerance. Differences in ethanol metabolism after chronic BD should be mainly explained by the large variability in the level of ethanol intake. Five naïve SD, W, and LE rats received an injection of an ethanol solution (20% v/v, 3 g/kg ip) at 14 weeks of age. Thirty and 240 min after the injection, rats were briefly anesthetized with isoflurane (5% for the induction, then 2% for the 2 min of the blood collection), and blood samples were collected from the sublingual vein in heparinized Eppendorf® tubes for immediate centrifugation. Ethanol concentration in the plasma was determined using the Analox® apparatus.

2.8 | Electrophysiology on hippocampus slices

After anesthesia with isoflurane, brains were removed and immersed in a cutting solution (220-mM Sucrose, 2-mM KCl, 1.3-mM NaH_2PO_4, 26-mM $NaHCO_3$, 6-mM $MgCl_2$, 0.2-mM $CaCl_2$, 10-mM glucose; pH 7.2–7.4; 4°C), and 400-μm-thick hippocampus slices were obtained with a vibratome (Leica VT1200S, Rueil-Malmaison, France). Slices were stored for 2 h at 21°C in a carbogen (95% O_2 and 5% CO_2) gassed artificial cerebrospinal fluid (aCSF: 125-mM NaCl, 3-mM KCl, 1.25-mM NaH_2PO_4, 25-mM $NaHCO_3$, 1.3-mM $MgCl_2$, 2.3-mM $CaCl_2$, 10-mM glucose; pH 7.2–7.4). Recorded slices, perfused with aCSF (28 ± 1°C, flow rate: 6 ml/min), were stimulated at the Schaffer collaterals using a bipolar tungsten electrode (PHYMEP, France) every 20 s. Field excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were recorded with a 3-M NaCl (1–3 MΩ) filled glass microelectrode placed into the stratum radiatum of the CA1 area. For each slice, an input/output relationship was performed to determine the maximal response and the test stimulus intensity was set to evoke 50% to 60% of the maximal response. Signals were amplified (Grass amplifier, ×1000–2000),

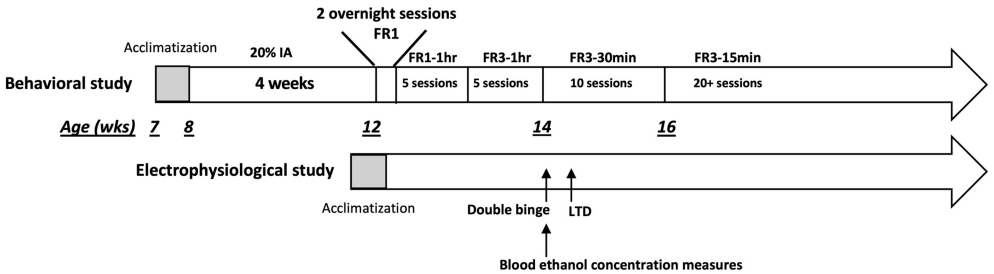


FIGURE 1 Time line of the experiments and treatments. Two cohorts of animals were used: One of the behavioral study (top) and the other one for electrophysiological study (bottom). The number of weeks, the age (in weeks) of the animals, the number and duration of sessions, and the schedule of reinforcement (FR, fixed ratio) are indicated

filtered (1–3 KHz), and recorded on computer with Signal software (CED, Cambridge, UK) for off-line analysis. LTD was induced by 900 paired stimuli (200-ms interpulse interval) delivered at 1 Hz (pLFS200–900). LTD magnitude is expressed as a percentage of change of the response averaged over the last 10 min of recording and compared with the normalized baseline level taken before LTD induction. For these experiments, *n* is the number of slices recorded.

2.9 | Data analyses

All data were presented as means ± standard error (SEM). Data were analyzed (SigmaPlot 11.0, SysStat Software, Inc.) using an analysis of variance (ANOVA) test (one or two ANOVA with or without repeated measures) followed by a Tukey multiple comparison test when a significant effect was observed for the data following a normal distribution and an equality of variances. When the data do not follow these criteria, a nonparametric analysis was performed (Kruskal–Wallis and Dunn's tests). For single comparison, we used a Student's *t* test (two-tails), and for the correlation, we used the Pearson correlation test. The significance threshold was fixed at $p < 0.05$. It is noteworthy that we run Tukey multiple comparison test even when only one main effect was found or no significant interaction between factors. Like the ANOVA, the Tukey test requires normal distribution and equality of variance but does not requires "protection" by a "significant" ANOVA.

3 | RESULTS

3.1 | Interstrain differences in the IA2BC paradigm

Regarding ethanol intake (Figure 2A), a two-way repeated measures-ANOVA (RM-ANOVA) revealed a significant effect of the group ($F_{2,536} = 98.41$, $p < 0.001$), the session ($F_{8,536} = 4.71$, $p < 0.001$), and a significant interaction between these two factors ($F_{16,536} = 4.21$, $p < 0.001$). The post hoc test revealed that LE rats were the only strain to escalate ethanol intake ($p < 0.001$ for all the sessions vs. the first one). They consumed significantly more ethanol across all sessions than W and SD rats (all *p*s < 0.001). SD rats consumed significantly more ethanol than W rats from the second to the last session (all *p*s < 0.05 except Session 7 in which $p = 0.07$). Results on water intake, total fluid intake, and preference (Figure 2B–D) are given as Supporting Information.

3.2 | Interstrain differences in the operant self-administration paradigm

First rats were submitted to two successive overnight sessions (16 h each) under an FR1 schedule (Figure 3A). During overnight sessions, rats did not have access to food as it is usually done.[23] Regarding the number of active lever presses, a two-way RM-ANOVA revealed an effect of the group ($F_{2,67} = 14.19$, $p < 0.001$), the session

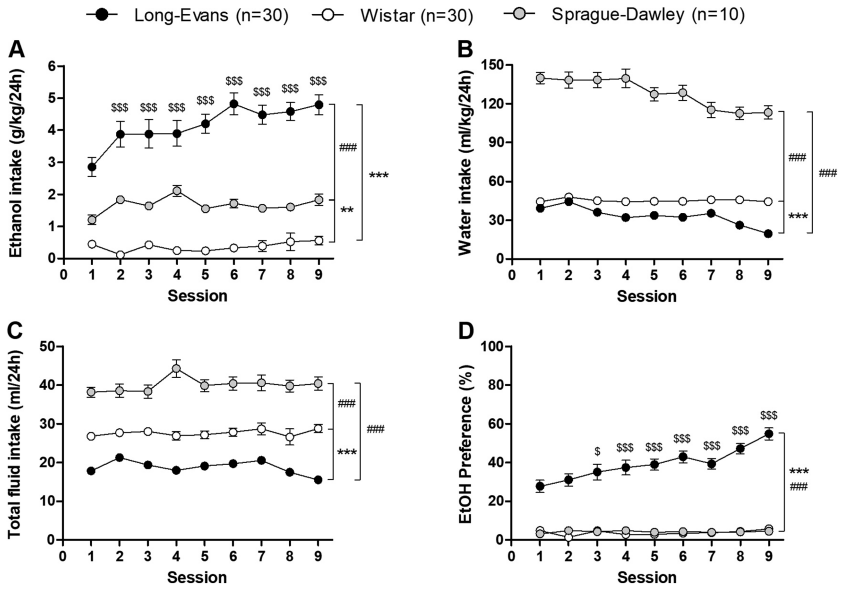


FIGURE 2 Strain differences (Wistar [W], Long–Evans [LE], and Sprague–Dawley [SD]) in the IA2BC paradigm prior to operant self-administration. (A) LE rats were the only strain to escalate their ethanol intake and consumed significantly more ethanol across sessions than W rats and SD rats. SD rats consumed significantly more ethanol across sessions than W rats. Results are expressed as a mean ± SEM of the ethanol intake relative to weight during the 24-h sessions (g/kg/24 h). (B) SD rats consumed significantly more water across sessions than W and LE rats. W rats consumed significantly more water than LE rats. Results are expressed as a mean ± SEM of the water intake relative to weight during the 24-h sessions (ml/kg/24 h). (C) SD rats consumed significantly more fluid in total than W and LE rats, W rats consumed significantly more fluid in total than LE rats. Results are expressed as a mean ± SEM of the total fluid intake relative to weight during the 24-h sessions (ml/24 h). (D) LE rats were the only strain to escalate their preference for ethanol and developed a significantly higher preference than W and SD rats across sessions. Results are expressed as a mean ± SEM of the proportion of ethanol consumed over total fluid consumed. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ versus W. $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ versus SD. $^{\$}p < 0.05$, $^{\$\$\$}p < 0.001$ versus first session

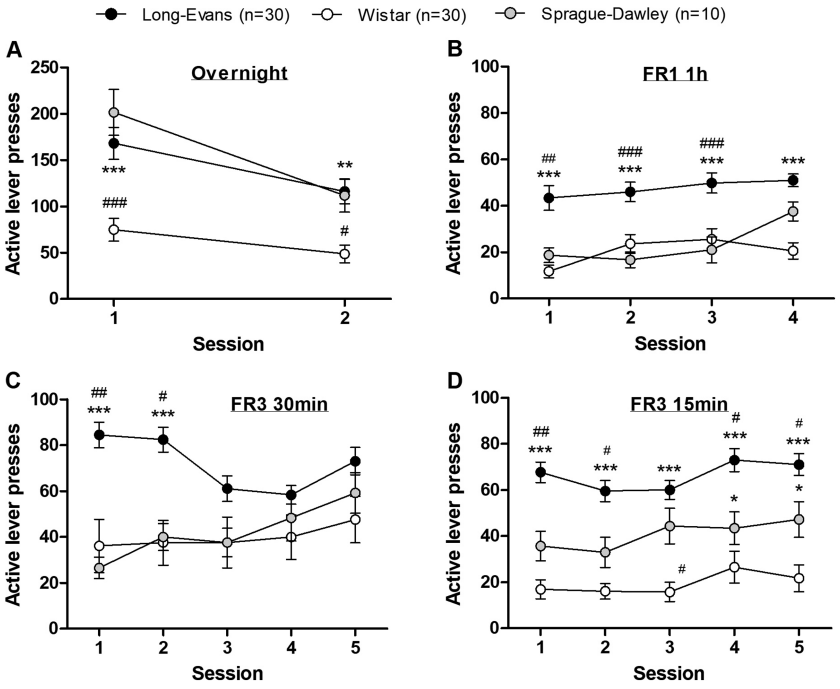


FIGURE 3 Strain differences in active lever presses during the operant self-administration (OSA) procedure.1 (A) The Long–Evans (LE) and Sprague–Dawley (SD) rats were performing significantly better than the Wistar (W) rats during the two overnight (ON) sessions. Results are expressed as a mean ± SEM of the number of presses on the active lever. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ versus W. $^{###}p < 0.001$ versus SD. (B, C, and D) LE rats were performing significantly better than W and SD rats during the OSA sessions. Results are expressed as a mean ± SEM of the number of presses on the active lever. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ versus W. $^{#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ versus SD

($F_{1,67}$ = 42.14, p < 0.001), and an interaction between the factors ($F_{2,67}$ = 3.98, p < 0.05). The post hoc test revealed that the W rats made overall significantly less active lever presses than the LE rats (p < 0.001) and SD (p < 0.001). After the overnight session, rats were exposed to different schedules and sessions duration from which the number of active lever presses for the last four (FR1 1 h) and five (FR3 30 min and FR3 15 min) stable sessions for each schedule are depicted in Figure 3B–D. In regards with the four FR1 sessions (Figure 3B), the two-way RM-ANOVA revealed a significant effect of both factors (group: $F_{2,198}$ = 23.58, p < 0.001 and sessions: $F_{3,198}$ = 4.92, p < 0.01) and a marginal interaction between those factors ($F_{6,198}$ = 1.87, p = 0.088). The Tukey test indicated a significant difference between the LE rats and both the W and SD rats for the three first sessions and only between the LE and the W for the fourth sessions. Concerning the FR3-30 min sessions (Figure 3C), the analysis of the data revealed an effect of both factors too (groups: $F_{2,264}$ = 5.36, p < 0.01 and session: $F_{4,264}$ = 4.08, p < 0.01) and an interaction between them ($F_{8,264}$ = 5.52, p < 0.001). The post hoc test indicated that the differences between the LE and both others strains are more important at the two first FR3-30 min sessions. In regards with the FR3-15 min sessions (Figure 3C), a two-way RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{2,264}$ = 33.59, p < 0.001), of the session ($F_{4,264}$ = 5.27, p < 0.001) but no interaction between these two factors ($F_{8,264}$ = 0.87, ns). LE rats made overall significantly more active lever presses than the W and the SD rats. We also found a punctual difference between the W and the SD rats, with the later showing higher levels of active lever presses.

In Figure 4, we depicted the results of the different schedules expressed in ethanol consumed (g/kg). The data analysis from the two overnight sessions revealed a significant effect of both factors (strain: $F_{2,67}$ = 26.11, p < 0.001 and session: $F_{1,67}$ = 35.89, p < 0.001) and an interaction between both factors ($F_{2.67}$ = 4.83, p < 0.001). The post hoc test indicated a significant difference between W and the other strains in Session 1 (p < 0.001) but only with the LE for the second session (p < 0.001). Concerning the FR1-1 h schedule, the two-way RM-ANOVA revealed a significant effect of both factors (strain: $F_{2,198}$ = 60.96, p < 0.001 and session: $F_{3,198}$ = 3.26, p < 0.05) and no interaction between both factors ($F_{6,198}$ = 0.98, ns). The post hoc test showed no difference between sessions within each strain but a significant difference between the LE group and both other groups for all sessions (p < 0.001). No difference between SD and W were observed. For the FR3-3 min sessions, the analysis revealed a significant effect of both factors (groups: $F_{2,264}$ = 23.92, p < 0.001 and session: $F_{4,264}$ = 3.371, p < 0.01) and an interaction between these factors ($F_{8,264}$ = 5.60, p < 0.001). Similarly, to the FR1-1 h session, the post hoc test revealed a significant difference between the LE rats and the two others strains for almost all the sessions and no difference between the W and SD (see figure legends for details). Finally, in regards with the 15-min FR3 sessions (Figure 4D), a two-way RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{2,264}$ = 59.56, p < 0.001), of the session ($F_{4,264}$ = 4.32, p < 0.01) and no interaction between both factors ($F_{8,264}$ = 1.19, p > 0.05). The post hoc test indicated a significant difference between the LE rats and the two other strains for each of the five stable sessions (all ps < 0.05). Between the SD and the W rats, the difference appeared only after the third stable session (all ps < 0.05) despite a trend for the two first sessions (p = 0.067 and p = 0.098, respectively). It is noteworthy that the inactive lever presses also showed differences between strains all along the acquisition of the BD behavior (see the Supporting Information and Figure S2). In addition to these differences, we also found that the ratio between active lever presses and earned rewards, that is, efficiency of the rats to get their reward, is slightly different depending on the strain (see the Supporting Information and Figure S1).

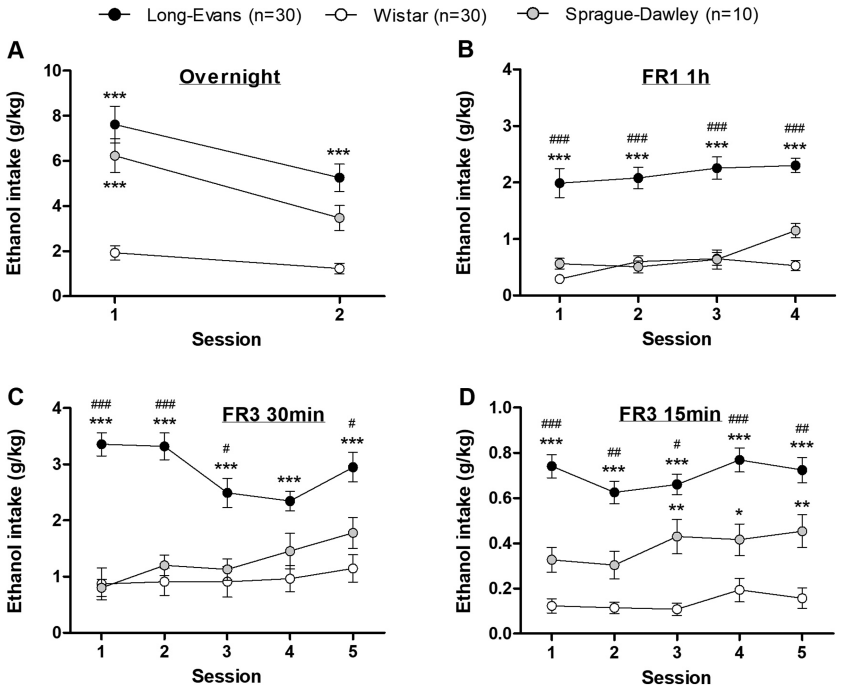


FIGURE 4 Individual cumulative active lever presses for each strain. Results are presented as cumulative number of active lever presses by bins of 3 min

Because propensity to ethanol drinking may be dependent upon individual animal differences, especially in outbred rats, we wanted to look at the individual differences among the three strains.[1] In Figure 5, individual data regarding the cumulative number of active lever presses are presented and show that only one SD rat and two W rats display a pattern of drinking similar to the one of the majority of the LE rats (rapid increase and high intake).

After reaching a baseline of consumption, the cumulative active lever presses (Figure 6A) show a linear increase of the number of active lever presses for the SD and W with a beginning with a relative low number of presses performed during the first 3 min. The LE rats exhibit a fast increase with a tendency to reach an asymptote at the end of the session. A two-way RM-ANOVA (time points) revealed an effect of the factor strains ($F_{2,252}$ = 28.23, p < 0.001), of the factor time point ($F_{4,252}$ = 78.81, p < 0.001), and an interaction between both factors ($F_{8,252}$ = 7.27, p < 0.001). In regards with intragroup evolutions, the SD and the W rats show a slow increase in presses, and no difference was observed between the two first time points. Within the LE group, all the time points were different from each other (all ps < 0.05) except between the two lasts (p = 0.7). LE rats are significantly different from the others strains whatever the time point selected (all ps < 0.01). It is only at the last time point that a difference emerges between the SD and the W rats (p < 0.05). Figure 4B presents the cumulative lever press data expressed as percentage of the final number of presses. The analysis of the individual pattern (Figure 5) shows that some rats from the SD and the W strains are able to develop a phenotype similar to the one of the vast majority of the LE. The latency to get the first ethanol reward was around six times shorter in LE (about 35 s) compared with the ones of SD and W rats (about 220 s) (Figure 6C). A Kruskal–Wallis analysis revealed a

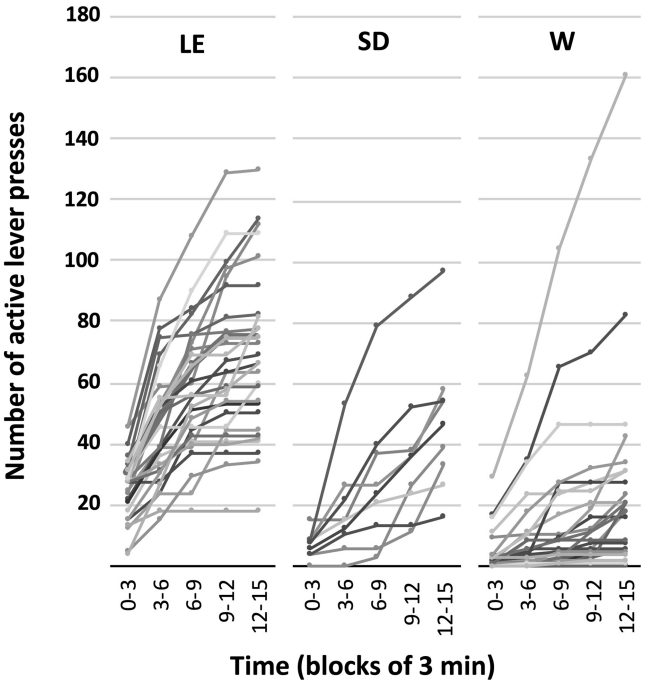


FIGURE 5 Ethanol intake (g/kg) during the operant self-administration (OSA) procedure. (A) The LE rats consumed significantly more ethanol during both ON sessions than the W rats, whereas the SD rats consumed significantly more ethanol than the W rats during the first session. Results are expressed as a mean ± SEM of the ethanol intake in g/kg. ***p < 0.001 versus W. (B, C, and D) The LE rats consumed significantly more ethanol than the SD and W rats across the OSA sessions. Results are expressed as a mean ± SEM of the ethanol intake in g/kg. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 versus W. $^{\#}p$ < 0.05, $^{\#\#}p$ < 0.01, $^{\#\#\#}$p < 0.001 versus SD. LE, Long–Evans; SD, Sprague–Dawley; W, Wistar

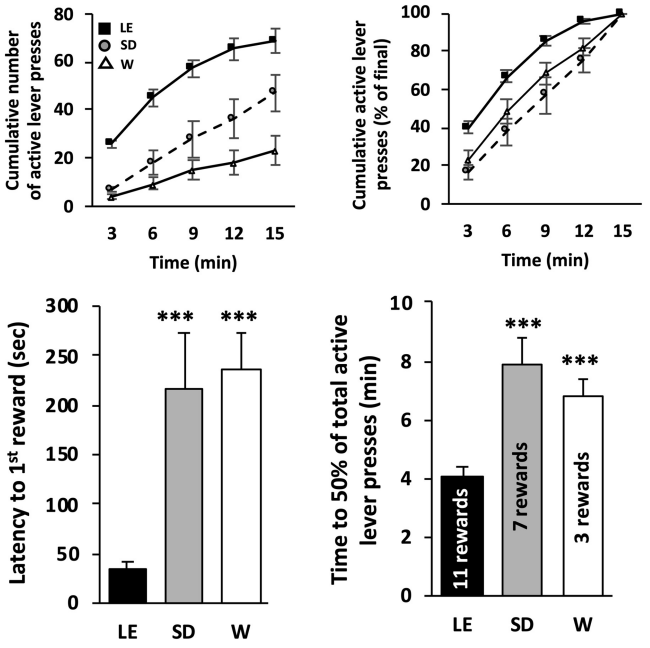


FIGURE 6 Pattern of ethanol self-administration. (A) Cumulative active lever presses for the three different strains of rats over a typical binge-like drinking (BD) self-administration session. Results are expressed as mean ± SEM of active ever presses by bin of 3 min. For clarity purpose, no statistical signs were depicted in this panel (see Section 3 for details). (B) Cumulative lever presses normalized to total active presses. Results are expressed as mean ± SEM of the percentage of final amount of active ever presses. (C) Latency to obtain the first reward (after three active lever presses). Results are expressed as mean ± SEM latency in seconds. n = 30 Long–Evans (LE), 10 Sprague–Dawley (SD), 30 Wistar (W). ***p < 0.001 versus LE. (D) Latency to perform 50% of the total number of active lever presses expressed in mean ± SEM. n = 30 (LE), 10 (SD), 30 (W). ***p < 0.001 versus LE. The numbers indicated within each bar graph represent the actual number of rewards obtained during the time depicted

main effect of the factor strains (K = 32.08, p < 0.001) and the post hoc test (Dunn) indicated a significant difference between the strains LE and both SD and W rats (p < 0.001). LE rats were also the fastest to reach 50% of their maximum consumption. When comparing the time to reach 50% of the total number of active lever presses in 15 min, LE rats consumed 11 rewards (in only 4 min), whereas SD rats consumed seven rewards in 8 min and W rats consumed only three rewards in about 6.5 min (Figure 6D). The one-way ANOVA revealed a significant effect of the factor strain ($F_{2,62}$ = 13.28, p < 0.001). The post hoc test indicates a significant difference between the LE and the two other strains (p < 0.001) and no difference between the SD and the W rats.

3.3 | Interstrain differences in hippocampus long-term synaptic depression 48 h after ethanol binges

Electrophysiological recordings are depicted on Figure 7A. There was no interstrain difference in the EPSP slope after NaCl treatment (Figure 7B). However, there was an interstrain difference after ethanol treatment regarding the LTD magnitude (Figure 7C). Regarding the LTD magnitude, the two-way ANOVA (Figure 5C) showed a significant effect of strain ($F_{2,28}$ = 5.903, p = 0.007), no significant effect of treatment ($F_{1,28}$ = 1.362, p = 0.253), and no significant effect of their interaction ($F_{2,28}$ = 1.749, p = 0.192). Tukey post hoc analysis revealed no differences in LTD magnitude for control slices between strains (SD vs. W: p = 0.917; SD vs. LE: p = 0.878; LE vs. W: p = 0.532) and a decrease of LTD magnitude in ethanol slices from LE rats compared with other strains (LE vs. W: p = 0.002; LE vs. SD: p = 0.037; SD vs. W: p = 0.805). There was no effect of ethanol in both SD (ethanol: −30.811 ± 4.788%, n = 4 slices, N = 4 rats; NaCl: −31.460 ± 3.877%, n = 3, N = 3; p = 0.939) and W rats (ethanol: −35.314 ± 3.157%, n = 6, N = 3; NaCl: −34.568 ± 2.36%, n = 6, N = 3; p = 0.908) with 100% of tested slices being unaffected by ethanol. In contrast, in LE rats, ethanol decreased LTD magnitude compared with control (ethanol: −13.452 ± 5.210%, n = 9, N = 6; NaCl: −27.655 ± 4.615%, n = 6, N = 3; p = 0.022), and it is striking to notice that this occurred in two-thirds slices tested while the remaining ones showed unaltered LTD (Figure S3).

Peak of BECs 30 min after intraperitoneal injection of a dose of 3 g/kg showed no difference between the strains (Figure S4A). A difference appeared only at the second time point suggesting a faster metabolism of ethanol by the LE as compared with the SD but not the W rats (Supporting Information and Figure S4A,B).

4 | DISCUSSION

This study suggests that the LE strain is the ideal one to investigate the BD behavior in a paradigm in which the IA2BC procedure is used prior to the operant self-administration procedure. Hippocampal synaptic plasticity is also specifically impaired in the LE strain after BD exposure.

Escalation of ethanol drinking and ethanol preference was observed only in the LE strain and was similar to that we and other studies previously described in LE rats.[10,24] LE rats reached 5 g of pure ethanol/kg bodyweight/d that is more than 10 times higher than W rats and twice than SD rats. They also reached an ethanol-preferring phenotype because their ethanol preference exceeded 50% at the last session, whereas the ethanol preference of the two other strains stayed very low and did not escalate their preference. The fact that we observed very low levels of both ethanol intake and preference in both SD and W rats is in contrast with results of previous studies that showed a robust escalation.[9,10] Most of the studies that employed the IA2BC procedure used LE and W rats, and some studies used SD rats; escalation has been reported for the three strains (see Carnicella et al[7] for review). Numerous factors may contribute to our results showing the lack of escalation in both W and SD rats. First, our housing conditions and our IA2BC procedure may have influenced the propensity for drinking escalation. Our rats are housed with no enrichment in their isolated ventilated home cages, and we started alcohol access of the IA2BC during the light cycle. In procedures that

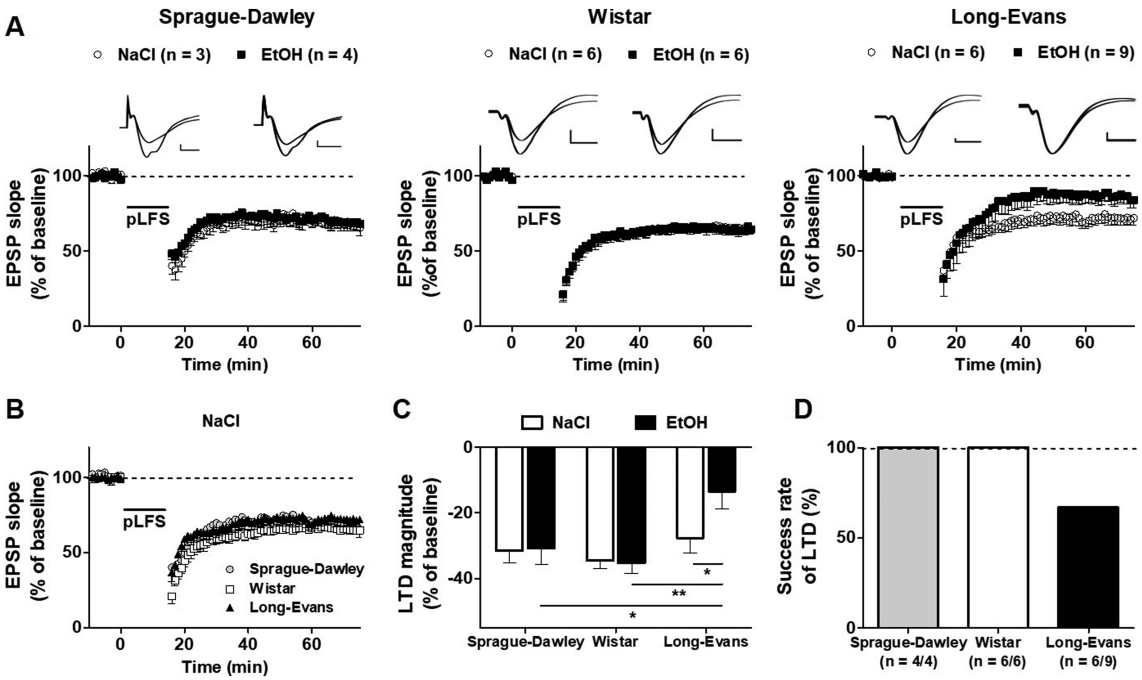


FIGURE 7 Strain differences in synaptic long-term depression (LTD) in hippocampus slice 48 h after ethanol binges. (A) Top panel: averaged raw signals during baseline and at the end of the recording (vertical calibration bar: 0.1 mV; horizontal calibration bar: 5 ms). Bottom panel: time course of long-term depression in Sprague–Dawley (SD), Wistar (W), and Long–Evans (LE) rats 48 h after ethanol. (B) Time course of LTD in NaCl SD, W, and LE rats. (C) Bar graph illustrating the LTD magnitude in NaCl and ethanol conditions between strains. LTD magnitude after ethanol was significantly lower in LE rats compared with W and SD rats. (D) Success rate of LTD between strains. LTD was successfully induced in all slices tested from SD and W rats, whereas only three slices exhibited LTD in LE rats. Mean values are given ± SEM. *n* is the number of slices. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$

start the session in the light cycle, rats seem to consume lower levels of ethanol for several hours after the first 30 min of BD (possibly until the dark cycle begins) and then consume high levels during the dark cycle.[7] Unfortunately, we did not measure ethanol intake during the first 30 min of alcohol access to see if this could have influenced the drinking pattern of the different strains. The amount of consumed alcohol after escalation is variable in LE (3–4 to 5–6 g/kg/24 h), W (3.4 to 5.8 g/kg/24 h), and SD (4.3 to 5.6 g/kg/24 h) rats.[7] Another study that used a three-bottle-choice procedure (water, ethanol 5%, and ethanol 20%) reported very little or no escalation in ethanol intake with a two-fold-difference in ethanol intake in W rats from five different suppliers.[12] Overall, interstrain, intersupplier, and inter-laboratory variability in the amount of ethanol consumed and in the drinking escalation function has to be considered.[7] It is striking to note that genetic and epigenetic factors in the hippocampus may be involved in the drinking pattern in the IA2BC paradigm. In this regard, it has been shown that W rats differentially consuming alcohol in the IA2BC paradigm differ in epigenetically determined expression of BDNF exon VI in the hippocampus during early abstinence.[25]

Interstrain differences were also observed in the operant procedure indicating difference in learning abilities. During the first overnight sessions of operant self-administration, W rats displayed the lowest level of active lever responses, whereas SD rats displayed a better discrimination of the active lever. During the 15-min FR3 sessions, the W rats displayed a better discrimination of the active lever. During the 1-h FR1 and 30-min FR3 sessions, LE rats displayed higher level of active lever responses compared with other strains. The interstrain difference in the level of ethanol intake observed in the BD-operant session (15 min, FR3) was similar to that observed in the IA2BC procedure with the LE strain consuming the highest and W the lowest amount of ethanol and the SD were intermediate. Thus, the level of ethanol intake during the escalation procedure could predict the interstrain differences in the operant BD procedure. From the present study, the most important result is that we can propose that the LE strain seems to be the ideal strain in our recently developed animal model useful in the study of BD.

Learning of operant self-administration is greatly influenced by prior drinking history from intermittent access. The IA2BC procedure may be effective in inducing significant level of ethanol self-administration in the operant procedure when sucrose is not used.[23] Carnicella et al[7] have shown in LE rats that the success rate is 70% to reach the 0.4 g/kg bodyweight/30 min in the operant procedure after the IA2BC without using sucrose. Thus, in the whole population of LE rats, 20% did not reach the 4 g/kg bodyweight/d in the IA2BC procedure, and thereafter, 10% did not reach the 0.4 g/kg bodyweight/30 min cut-off in the operant procedure, leading to a 70% success rate.[7] Without the IA2BC procedure, the success rate was only 40%.[7] In our study, 77% of animals from the LE group (23/30), 0% (0/10) from the SD group, and only 3% (1/30) of the animals of the W group reached the 4 g/kg bodyweight/d cut-off in

the IA2BC procedure. Furthermore, in the operant procedure, 90% of the animals from the LE group (27/30), 80% (8/10) from the SD group, and only 7% of the animals from the W group (2/30) reached the 0.4 g/kg bodyweight/15 min cut-off. Our results on the LE strain are very similar to those of Carnicella et al[7] and confirm that the IA2BC is able to facilitate ethanol self-administration in the operant procedure and that the LE strain is the ideal strain. Even though none of the SD rats reached the threshold of 4 g/kg in the IA2BC procedure, 80% of rats reached the intoxication threshold of 0.4 g/kg in operant self-administration procedure but remained below the level of drinking of the LE rats. Therefore, the level of consumption in the IA2BC procedure is not predictive of the level of consumption in the operant paradigm.

The difference in the levels of ethanol intake in the IA2BC between strains is similar to that in the operant self-administration procedure with the FR3 schedule of our model useful in the study of BD: LE > SD > W rats. Previous study has also demonstrated that LE rats consumed more ethanol than other strains such as the W and SD rats.[2] However, using a different procedure such as the sucrose-fading procedure, previous study has shown that LE rats drink less ethanol than W and SD rats.[26] Overall, our results confirm that ethanol drinking propensity, ethanol drinking escalation in the IA2BC procedure, and ethanol BD in our model using the operant self-administration procedure are strongly interstrain dependent. Regarding the IA2BC procedure, our results and those of others suggest that the LE strain is ideal.[8] We show here that this strain is also the ideal one in the model useful in the study of BD we developed by combining the IA2BC procedure with the 15-min session of FR3 20% ethanol-operant self-administration procedure. Our results on BD using the LE strain are in line with those of previous studies that demonstrated high level of ethanol intake in this strain compared with the other rat strains. Our results also show that LE rats are the fastest consumers with the shortest time to reach 50% of their maximum consumption in 15 min. Thus, LE rats consume a large quantity of alcohol in just a few minutes making them excellent binge drinkers. Our analysis of the cumulative number of lever presses further confirmed that the LE strain is the ideal one regarding face validity of an animal model useful in the study of human BD behavior. Our data show that LE rats display a very low latency to get the first alcohol reward (40 s) and to reach their 50% of maximum in the number of active lever presses in only 4 min to consume 11 rewards. The two other strains displayed six times higher latency to get their first ethanol reward and about two times more time to reach their 50% of maximum in the number of active lever presses with only seven and three rewards for SD and W, respectively. It is noteworthy that previous studies have suggested that LE rats reach high BECs with lower levels of ethanol intake compared with W, SD, and alcohol-preferring (P or Sardinian) rats.[9–11] LE rats may thus experience subjective response to the rewarding effects of ethanol at a lower level of ethanol intake and consequently may display higher liability to escalate their ethanol intake and initiate BD behavior compared with other rat strains. Those results are in contrast with our results. We did not find higher BECs in LE rats compared with the two other strains at 30 min after ethanol injection, whereas LE rats displayed lower BECS at 240 min. The decrease in BECs between 30 and 240 min was higher in LE compared with that of SD rats but not that of W rats. Quick cycles of elevated and low BECs have been suggested to be an important component of the BD phenotype's establishment. In accordance with the withdrawal kindling hypothesis in humans, such repeated cycles induce structural and functional brain changes and have been associated with cognitive and affective deficits.[27] A more complete study on interstrain differences in ethanol metabolism needs to be carried out because we did not measure BECs after a voluntary BD session of self-administration and after several weeks of BD.

We observed that about two thirds of our population of LE rats developed BD behavior, thus revealing interindividual susceptibility to develop this behavior as observed in humans. A recent study demonstrated that biological aspects related to ethanol preference were uncovered to be due to the individual animal differences in outbred rats.[1] Further studies are needed in order to explore brain mechanisms mediating this liability. In addition, it is noteworthy that our SD rats do not exhibit similar alcohol consumption levels as reported in a study from Bartlett's laboratory[9] and rising again the point made by Palm et al[12] showing strong differences in ethanol consumption within a same strain but from different suppliers. This makes somehow very difficult to compare studies from different places around the globe and all the housing conditions should always be detailed because we observed that the delay between the arrival and the beginning of the drinking sessions, or the number of animals per cage, or the level of enrichment can greatly affect the levels of ethanol consumption and thus escalation and BD propensity (personal observations).

Most of the studies on voluntary BD in rodents are using the drinking-in-the-dark model in inbred mice.[28] The vast majority of studies on operant ethanol self-administration in rodents has been carried out in rats, and only very few studies have been published in mice.[29] Rats have been suggested to be the smart choice for studies on behavioral genetics and particularly in the addiction field.[30] We recently proposed a new procedure in outbred rats to mimic BD behavior, and we demonstrated that our model displays good face validity and predictive validity.[13–16] Our animal model that is useful in the study of BD is based on the combination of the IA2BC procedure followed by 15-min daily session of 20% ethanol-operant self-administration.[14] The use of heterogeneous outbred rodents in constant controlled conditions seems to be advantageous for translatability into human BD behavior.[1,16] Here, we provide new data demonstrating that the LE strain is the ideal strain to study BD behavior. Further studies are still needed in order to investigate the effects of sex and of suppliers. Despite the use of constant controlled conditions, previous studies on heterogeneous outbred W rats have stressed out the influenc of different suppliers on ethanol intake in the IA2BC procedure and have also shown the influence on naltrexone response.[31]

It is striking to note that we observed the same interstrain differences in both the IA2BC and operant self-administration procedures. The two procedures are completely different and may require different neuroadaptations and brain processes: drinking driven either by

the bottle availability and the low level of effort to get ethanol (IA2BC in the homecage) or ethanol-associated cues (operant self-administration procedure in the novel environment of the skinner box) associated with the higher demand of pressing on a lever (motivational aspects). By combining two procedures, IA2BC and operant self-administration, this paradigm asks the question of the relevance of each procedure or their combination regarding AUD. The IA2BC procedure induces a facilitation of ethanol intake with an escalation of the intake assessed with two bottles and also facilitates future ethanol drinking in the operant self-administration task.[7] Six to seven weeks of IA2BC induce a long-lasting increase in both ethanol intake and preference even after 40 days of abstinence.[10] The combination of the two procedures has been suggested to be useful to study alcohol abuse.[7] The two procedures (IA2BC [3 days a week] and operant self-administration [5 days a week]) are characterized by repeated cycles of excessive drinking and abstinence (unlike continuous ethanol access paradigm) that may induce neuro-adaptations relevant to AUD, thus rendering LE rats sensitive to AUD treatments such as acamprosate and naltrexone.[10] In our own studies, we demonstrated that both rats exposed to either IA2BC paradigm or rats made dependent in the post-dependent state model and tested in operant self-administration procedure are sensitive to a HDAC inhibitor.[24] Finally, another study that investigated strain differences in SD versus inbred Lewis rats suggested that operant self-administration studies are more highly predictive of the reinforcing properties of ethanol.[32]

Based on the results of our behavioral experiments, we wished to know (or needed to check) whether electrophysiological properties of neuronal network were the same in the different strains and whether ethanol-induced alterations of these properties were similar.

For this purpose, we chose a passive exposure to ethanol (same level of ethanol exposure for every strain), and we analyzed synaptic LTD magnitude in the hippocampus, an electrophysiological signal related to cognitive function that is sensitive to ethanol in rodents.[21,33] Our results on BD using the LE strain are in line with those of previous studies that demonstrated high susceptibility to ethanol-induced brain and liver damages in this strain compared with the other rat strains. Furthermore, our results showing that LTD in hippocampal slices is almost abolished 48 h after a BD exposure only in the adult LE strain had never been found before and reveals a specific sensitivity of such synaptic property in this strain. It is striking that our measurements in slices from control animals demonstrate that there is no strain effect on LTD magnitude in naïve conditions (i.e., before ethanol exposure), hence reinforcing the interest to study LE rats in the context of ethanol exposure. In addition, it is striking to notice that we found that about two thirds of our population of LE rats developed BD behavior and we also found that about two thirds of slices from LE rats were sensitive to BD exposure on hippocampal synaptic plasticity. Altogether, our results suggest that the LE strain is of particular interest to model BD behavior in humans regarding both behavior and cognitive deficits. Regarding the other strains and in contrast to LE, lack of ethanol sensitivity of synaptic plasticity in adult SD rats has been shown previously[34] and is reflected in learning behavior.[35] For adult W rats, the lack of ethanol sensitivity of synaptic plasticity is also a new result because in this strain, only one paper showed an abolition of LTD although after chronic ethanol exposure.[36] Interestingly, LTD abolition found in adult LE rats 48 h after two BD exposures is similar to LTD abolition in SD rats exposed to the same ethanol procedure but during adolescence,[17,18] suggesting again a specific sensitivity of LE rats to ethanol. It is difficult to explain how the different responses to BD exposure may occur. However, induction of LTD was performed using a PLFS200-900 stimulation known to trigger NMDA-dependent LTD on adolescent SD rats[21,37] and on both adolescent and adult W rats[38] and LE rats.[36] It is thus unlikely that difference in sensitivity to ethanol arises from a different form of LTD triggered in our experimental conditions. Another possibility would be that ethanol triggered different neuroadaptations in the different strains, but to the best of our knowledge, no study has yet addressed this issue. Further understanding the mechanisms in the different responses to ethanol was out of the scope of the present study and will require dedicated studies.

This study has some limitations that need to be pointed out. First, our aim was not to explore a causal link between the propensity to drink ethanol and the sensitivity to the synaptic plasticity impairing effect of acute ethanol. Our goal was to focus on interstrain differences in two different paradigms when investigating chronic BD behavior on the one hand and the impact of acute BD exposure on the other hand. Second, we did not use female because analysis of gender difference was beyond the scope of the present study. In addition, the effect of different suppliers was not investigated because it would be more appropriate to use one strain from at least three different suppliers and it becomes the main objective of a new whole study. It is also important to notice that the lack of escalation in ethanol drinking in the IA2BC paradigm in our W and SD rats potentially due to numerous factors (strain, procedure, and supplier) may have influenced the propensity of these two strains to BD behavior in the operant paradigm. Finally, because BECs were measured at 14 weeks of age, we cannot rule out potential effects of age on ethanol metabolism.

In summary, the present study brings new data regarding the genetic vulnerability to BD behavior and also to ethanol-induced deficits in synaptic plasticity. Further studies are needed in order to identify genes and neuronal mechanisms involved in this vulnerability and to explore the effect of gender and different suppliers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. This study was supported by the Conseil Régional des Hauts-de-France (CR HdF), the Interministerial Mission for the fight against drugs and drug addiction (MILEDCA)-National Institute of Health and Medical Research (INSERM)-Institute of Cancer (InCa) (Contracts A08095ES and A09119ES), Institut de France/Fondation NRJ “Biology of addiction” 2009 grant, and the National Academy of Medicine. PS is supported by a doctoral fellowship from the CR HdF and INSERM, and CD is supported by a doctoral fellowship from the Ministry of Higher Education of Research and Innovation.

CONFLICT OF INTEREST

All authors reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest related to the work of the present study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.J, O.P., and M.N. designed the research; P.S., C.D., V.J., and J.J. performed the research; P.S., C.D., and J.J. analyzed the data; and P.S., J. J, C.D., O.P., and M.N. wrote the manuscript.

FUNDING INFORMATION

P.S. and C.D. have a PhD fellowship funded by the French Ministry of Superior Education, Research and Innovation.

ORCID

Olivier Pierrefiche https://orcid.org/0000-0003-1427-9332
Jérôme Jeanblanc https://orcid.org/0000-0003-0353-2777
Mickael Naassila https://orcid.org/0000-0002-9788-0918

REFERENCES

1. Augier E, Barbier E, Dulman RS, et al. A molecular mechanism for choosing alcohol over an alternative reward. *Science*. 2018;360 (6395):1321-1326.
2. Khanna JM, Kalant H, Shah G, Sharma H. Comparison of sensitivity and alcohol consumption in four outbred strains of rats. *Alcohol*. 1990;7(5):429-434.
3. DeNucci SM, Tong M, Longato L, et al. Rat strain differences in susceptibility to alcohol-induced chronic liver injury and hepatic insulin resistance. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:1-16.
4. Aufrère G, Le Bourhis B, Beaugé F. Ethanol intake after chronic intoxication by inhalation of ethanol vapour in rats: behavioural dependence. *Alcohol*. 1997;14(3):247-253.
5. Wayner MJ, Greenberg I, Tartaglione R, Nolley D, Fraley S, Cott A. A new factor affecting the consumption of ethyl alcohol and other sapid fluids. *Physiol Behav*. 1972;8(2):345-362.
6. Wise RA. Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia*. 1973;29(3):203-210.
7. Carnicella S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*. 2014;48(3): 243-252.
8. Moorman DE, Aston-Jones G. Orexin-1 receptor antagonism decreases ethanol consumption and preference selectively in high-ethanol–preferring Sprague–Dawley rats. *Alcohol*. 2009;43(5): 379-386.
9. Bito-Onon JJ, Simms JA, Chatterjee S, Holgate J, Bartlett SE. Varenicline, a partial agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, reduces nicotine-induced increases in 20% ethanol operant self-administration in Sprague–Dawley rats. *Addict Biol*. 2011;2011 (3):440-449. https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00309.x
10. Simms JA, Steensland P, Medina B, et al. Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long–Evans and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32(10):1816-1823.
11. Sabino V, Kwak J, Rice KC, Cottone P. Pharmacological characterization of the 20% alcohol intermittent access model in Sardinian alcohol-preferring rats: a model of binge-like drinking. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;2013(4):635-643. https://doi.org/10.1111/acer.12008
12. Palm S, Roman E, Nylander I. Differences in voluntary ethanol consumption in Wistar rats from five different suppliers. *Alcohol*. 2011; 2011(6):607-614. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.11.005
13. González-Marín MC, Lebourgeois S, Jeanblanc J, Diouf M, Naassila M. Evaluation of alcohol use disorders pharmacotherapies in a new preclinical model of binge drinking. *Neuropharmacology*. 2018; 140:14-24.
14. Jeanblanc J, Sauton P, Jeanblanc V, et al. Face validity of a pre-clinical model of operant binge drinking: just a question of speed. *Addict Biol*. 2019;24(4):664-675.
15. Lebourgeois S, González-Marín MC, Jeanblanc J, Naassila M, Vilpoux C. Effect of *N*-acetylcysteine on motivation, seeking and relapse to ethanol self-administration. *Addict Biol*. 2018;23(2): 643-652.
16. Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, Martinetti MP, Naassila M. Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;2018:112-121. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.002
17. Rolland B, Naassila M. Binge drinking: current diagnostic and therapeutic issues. *CNS Drugs*. 2017;31(3):181-186.
18. Schulteis G, Archer C, Tapert SF, Frank LR. Intermittent binge alcohol exposure during the periadolescent period induces spatial working memory deficits in young adult rats. *Alcohol*. 2008;42(6): 459-467.
19. Wilson S, Bair JL, Thomas KM, Iacono WG. Problematic alcohol use and reduced hippocampal volume: a meta-analytic review. *Psychol Med*. 2017;47(13):2288-2301.
20. Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learn Mem*. 2016;23(10):515-533.
21. Silvestre de Ferron B, Bennouar K-E, Kervern M, et al. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: key role for GLUN2B subunit. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(1): pyv087.
22. Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, et al. Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addict Biol*. 2020;25:e12760.
23. Simms JA, Bito-Onon JJ, Chatterjee S, Bartlett SE. Long–Evans rats acquire operant self-administration of 20% ethanol without sucrose fading. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(7):1453-1463.
24. Simon-O'Brien E, Alaux-Cantin S, Warnault V, Buttolo R, Naassila M, Vilpoux C. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate decreases excessive ethanol intake in dependent animals. *Addict Biol*. 2015;20(4):676-689.
25. Peregud D, Stepanichev M, Gulyaeva N. Drinking pattern in intermittent access two-bottle-choice paradigm in male Wistar rats is associated with exon-specific BDNF expression in the hippocampus during early abstinence. *J Mol Neurosci*. 2020;1-14 26 June 2020. https://doi.org/10.1007/s12031-020-01645-1
26. Gauvin DV, Moore KR, Holloway FA. Do rat strain differences in ethanol consumption reflect differences in ethanol sensitivity or the preparedness to learn? *Alcohol*. 1993;10(1):37-43. https://doi.org/10.1016/0741-8329(93)90051-O
27. Stephens DN, Duka T. Cognitive and emotional consequences of binge drinking: role of amygdala and prefrontal cortex. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2008;363(1507):3169-3179.
28. Huynh N, Arabian NM, Asatryan L, Davies DL. Murine drinking models in the development of pharmacotherapies for alcoholism: drinking in the dark and two-bottle choice. *J Vis Exp*. 2019. 7 January 2019;(143):e57027. https://doi.org/10.3791/57027
29. González-Marín MDC, Coune F, Naassila M. Vulnerability to ethanol sensitization predicts higher intake and motivation to self-administer ethanol: proof of the incentive salience sensitization theory? *Addict Biol*. 2019;e12833. 24 November 2019. https://doi.org/10.1111/adb.12833
30. Parker CC, Chen H, Flagel SB, et al. Rats are the smart choice: rationale for a renewed focus on rats in behavioral genetics. *Neuropharmacology*. 2014;76:250-258.

31. Momeni S, Segerström L, Roman E. Supplier-dependent differences in intermittent voluntary alcohol intake and response to naltrexone in Wistar rats. *Front Neurosci*. 2015;9(424):1-13.
32. Wilson AW, Neill JC, Costall B. Strain differences in ethanol preference and reinforced behaviour: a comparison of two-bottle choice and operant self-administration paradigms. *Behav Pharmacol*. 1997;1997(1):37-46. https://doi.org/10.1097/00008877-199702000-00004
33. Coune F, Silvestre de Ferron B, González-Marín MC, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Resistance to ethanol sensitization is associated with a loss of synaptic plasticity in the hippocampus. *Synapse*. 2017;71(2):e21899. https://doi.org/10.1002/syn.21899
34. Pyapali GK, Turner DA, Wilson WA, Swartzwelder HS. Age and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol*. 1999;19(2):107-111. https://doi.org/10.1016/S0741-8329 (99)00021-X
35. Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(2):416-421.
36. Thinschmidt JS, Walker DW, King MA. Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. *Synapse*. 2003;2003(4):189-197. https://doi.org/10.1002/syn.10203
37. Kemp N, Bashir ZI. NMDA receptor-dependent and -independent long-term depression in the CA1 region of the adult rat hippocampus in vitro. *Neuropharmacology*. 1997;36(3):397-399.
38. Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci*. 2000;12(1):360-366.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Sauton P, Deschamps C, Jeanblanc V, Pierrefiche O, Jeanblanc J, Naassila M. Interstrain differences in voluntary binge-like drinking behavior and in two acute ethanol injections-induced synaptic plasticity deficits in rats. *Addiction Biology*. 2021;26:e12992. https://doi.org/10.1111/adb.12992

Supplementary Informations

Supplementary Materials and Methods

20% Ethanol operant self-administration. Rats were trained to self-administer ethanol (0.1 mL of a 20% ethanol solution w/v per delivery, 3 sec of timeout). After 2 overnight sessions (FR1) rats were submitted to shorter sessions 5 days per week following a specific order of schedules: FR1 – 1 hour for 5-7 days, FR3 – 1 hour for 5-7 days and finally FR3 – 30 minutes until stable baseline of drinking was reached. To obtain the binge drinking phenotype, the duration of the sessions was then reduced again to 15 min. This reduction in the duration of the sessions leads to intoxicating levels of ethanol self-administration[13]. The number of active and inactive lever presses as well as the number of obtained rewards were recorded during each operant self-administration session. All sessions (except the overnight ones) were conducted between 2:00 pm and 5:00 pm.

Supplementary Results

Strain differences in the intermittent access 2-bottle choice (IA2BC) paradigm

Regarding water intake (fig. 1B), a 2-way RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{(2,533)}$ = 414.18, $p < 0.001$), the session ($F_{(8,533)}$ = 33.46, $p<0.001$) and a significant interaction between these 2 factors ($F_{(16,533)}$ = 4.21, $p < 0.001$). The *post hoc* test revealed that SD rats consumed significantly more water across all sessions than LE and W rats ($p < 0.001$) ; and that W rats consumed significantly more water than LE rats from the 3rd to the last session ($p < 0.01$ for sessions 3 to 9).

Regarding total fluid intake (fig. 1C), a 2-way RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{(2,536)}$ = 119.83, $p < 0.001$), the session ($F_{(8,536)}$ = 2.64, $p < 0.01$) and a significant interaction between these two factors ($F_{(16,533)}$ = 4.21, $p < 0.001$). The *post hoc* test revealed that SD rats consumed significantly more fluid in total across all sessions than LE and W rats ($p < 0.001$) ; and that W rats consumed significantly more fluid in total across all sessions than LE rats ($p < 0.001$).

Regarding preference for ethanol (fig. 1D), a RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{(2,536)}$ = 116.94, p<0.001), the session ($F_{(8,536)}$ = 7.57, p < 0.001) and a significant interaction between these two factors ($F_{(16,536)}$ = 8.12, p < 0.001). The *post hoc* test revealed that LE rats were the only strain to escalate their preference for ethanol (p = 0.011 for the 3rd session versus the 1st, p < 0.001 for all the following sessions versus the first). They developed a significantly higher preference for the ethanol solution across all sessions than W and SD rats (p < 0.001).

Strain differences in the operant self-administration paradigm

In the self-administration chambers, rats have access to 2 levers, one active (results described in the main part of the manuscript) but also an inactive lever on which the presses lead to no consequences. The analysis of the data collected revealed some differences between the 3 strains studied, whatever the schedule used (Supplemental fig.1 A-D). During the 2 overnight sessions, we observed a decrease in the number of inactive lever presses indicating the acquisition of the discrimination between the active and the inactive levers (Suppl. Fig. 1A). The analysis revealed a significant effect of both factors (groups: $F_{(2,67)}$ = 68.72, p < 0.001 and sessions: $F_{(1,67)}$ = 131.77, p < 0.001) and an interaction between those factors ($F_{(2,67)}$ = 32.61, p < 0.001). The *post hoc* test indicated that for both sessions, the SD pressed more on the inactive lever than the 2 other strains (p < 0.001). No difference between the W and the LE was observed within each session. Concerning the FR1-1hr sessions the W pressed less on the inactive lever that the SD and the LE (Suppl. Fig. 1B). The 2-way RM ANOVA conducted on these data revealed a significant effect of both factors (groups: $F_{(2,201)}$ = 18.16, p < 0.001 and sessions: $F_{(3,201)}$ = 5.95, p < 0.001) and an interaction between those factors ($F_{(6,201)}$ = 3.52, p < 0.01). The *post hoc* test indicated a significant difference between the W and the LE for all the sessions, and between the W and the SD for sessions 3 and 4. A difference between the SD and the LE group occurred on the session 4 (all p's < 0.05). For the 5 FR3-30 min sessions (Suppl. Fig. 1C), the analysis revealed a significant effect of the factor groups ($F_{(2,264)}$ = 46.48, p < 0.001) but no effect of the factor sessions ($F_{(4,264)}$ = 0.014, ns) and no interaction between both factors ($F_{(8,264)}$ = 0.363, ns). The Tukey test showed a significant difference between the W and both other strains for all (p's < 0.05) except for the 5th session. No difference was observed between the LE and the SD for the 5 sessions. Finally, during the 5 stable sessions under the FR3-15 min sessions (Suppl. Fig. 1D), the analysis revealed a significant effect of

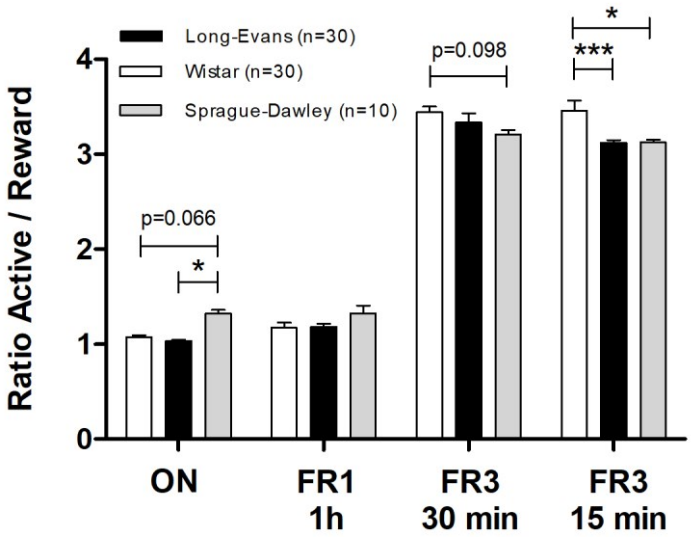
both factors (groups: $F_{(2,264)} = 26.89$, $p < 0.001$ and sessions: $F_{(4,264)} = 3.50$, $p < 0.01$) and an interaction between those factors ($F_{(8,264)} = 3.84$, $p < 0.001$). Within the W and within the LE rats, no differences between session was observed whereas a difference was observed within the SD group with session 1 significantly higher than sessions 3 and 5 (p's < 0.05). Between groups, the W remain very low in their inactive lever presses and significantly different from the other strains except for the last session (p's < 0.05). Within the session #1, the LE were also significantly different from the SD ($p < 0.001$).

We wanted to evaluate the ability to learn the task with the best efficacy in regards of the factor strains. We found that the ratio between active lever presses and earned rewards, i.e. efficiency of the rats to get their reward, is slightly different depending on the strain (Supplementary Fig. 2). A 2-way RM-ANOVA revealed a significant effect of the group ($F_{(2,194)} = 3.98$, $p < 0.05$), the protocol ($F_{(3,194)} = 868.51$, $p < 0.001$) and a significant interaction between these two factors ($F_{(6,194)} = 4.11$, $p < 0.001$). The *post hoc* Tukey analysis revealed that SD rats were significantly less efficient during the overnight sessions than the LE rats ($p < 0.05$), with a similar marginal effect compared with the W rats ($p = 0.066$). We also found a marginal effect of a lesser efficiency during the FR3 30min sessions in the W rats compared with the SD rats ($p=0.098$), and that W rats were significantly less efficient during the FR3 15min sessions than the LE ($p < 0.001$) and the SD ($p = 0.014$) rats.

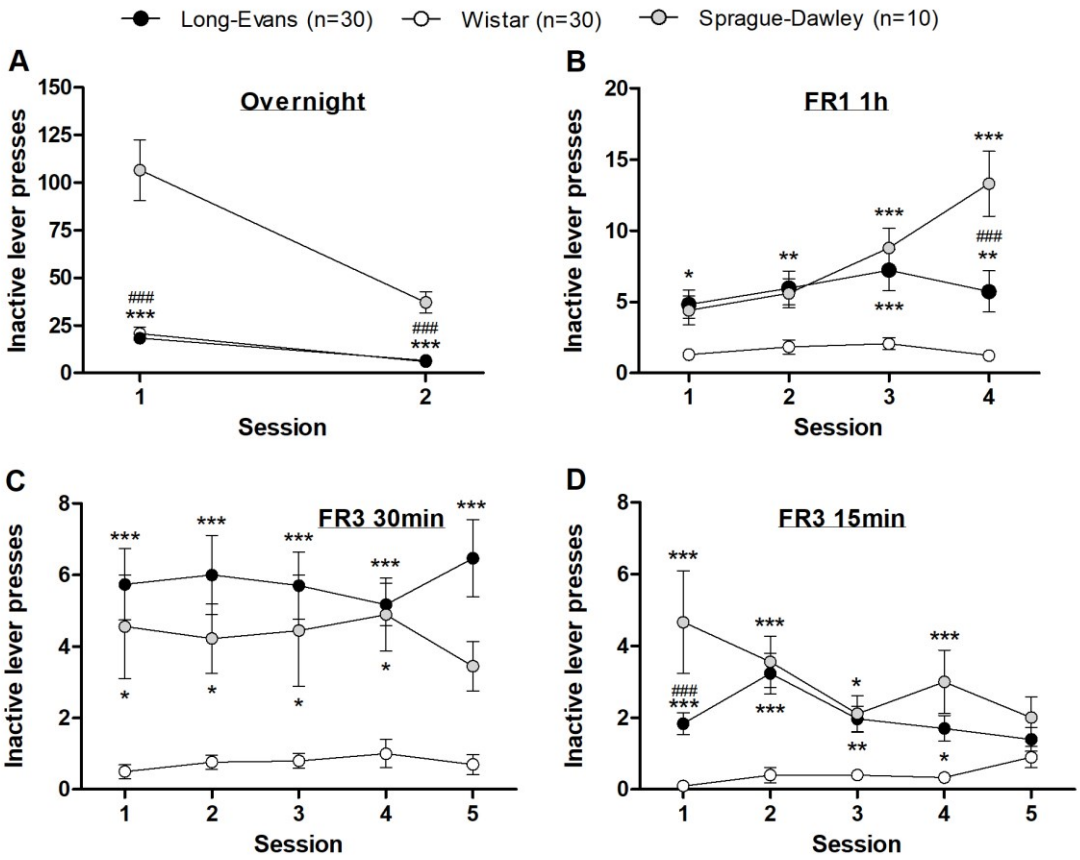
Strain differences in BECs

Thirty min after the injection of ethanol (3g/kg), the 3 strains of rats exhibited similar BECs but differences appear at the 240min time point (Suppl. Fig. 3A). The 2-way RM-ANOVA revealed a main effect of the strain ($F_{(2,12)} = 4.40$, $p < 0.05$), of the time points ($F_{(1,12)} = 157.73$, $p < 0.001$) and an interaction between both factors ($F_{(2,12)} = 5.62$, $p < 0.05$). The *post hoc* test indicated significant difference between time points within each strain of rats ($p < 0.001$) and no difference between the strains at the 30min time point. However, there is a significant difference between the BECs observed in the LE group vs the two other strains ($p < 0.05$) at the second timepoint (240 min). The LE rats metabolized faster ethanol as shown in Suppl. Fig. 3B. The analysis of the percentage of decrease in BECs between the 2 timepoints revealed a significant effect of the strain ($F_{(2,12)} = 12.30$, $p < 0.01$). the post hoc test showed a difference only between the W and the LE rats ($p < 0.001$).

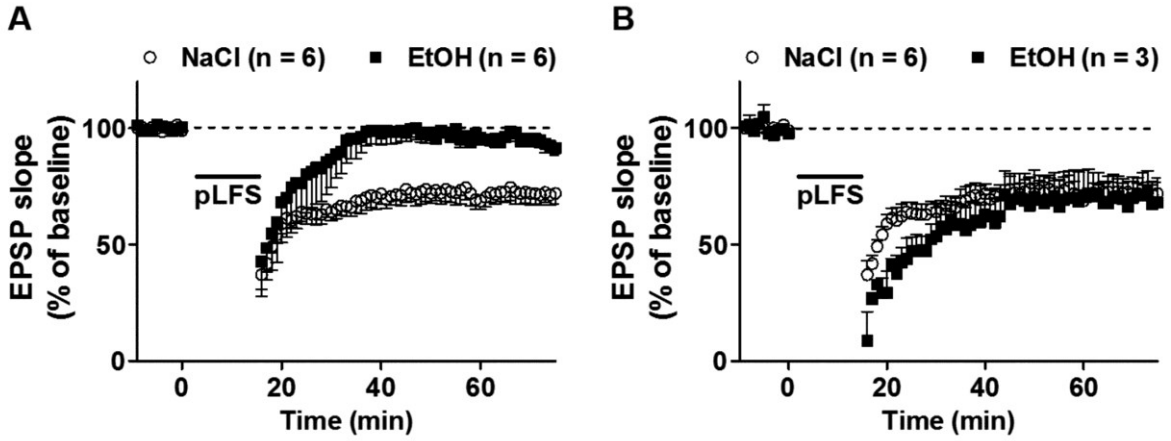
Supplementary Legends of Figures



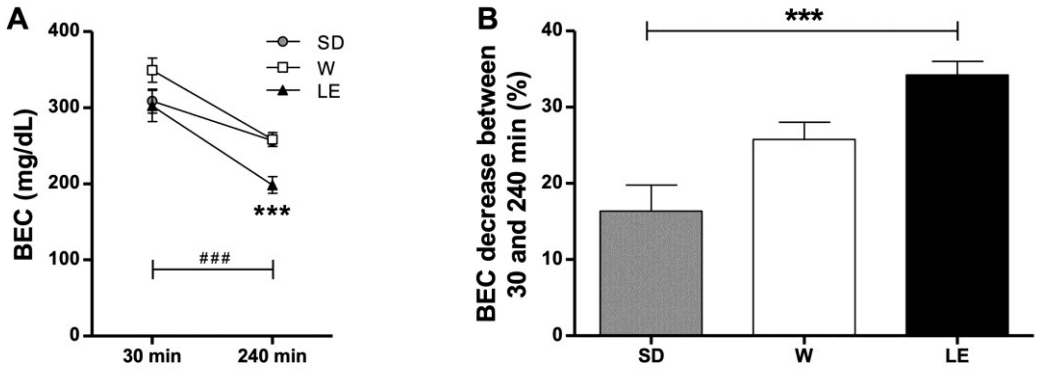
Supplemental figure 1: Strain differences in efficiency during the OSA procedure. The SD rats were the least efficient strain during the overnight sessions, while the W rats were the least efficient strain during the Fixed Ratio 30min (FR3 30min) and Fixed Ratio 15min (FR3 15min) sessions, pressing the active lever more times than necessary to earn a reward. Results are expressed as a mean ± SEM of the ratio between active lever presses and reward delivery. *p<0.05, ***p<0.001.



Supplementary figure 2: Strain differences in inactive lever presses during the OSA procedure. (A) The SD rats were pressing the inactive lever significantly more than the LE and W rats during the ON sessions. Results are expressed as a mean ± SEM of the number of presses on the inactive lever. ***p<0.001 *versus* W. ###p<0.001 *versus* SD. (B) (C) (D) All strain correctly learned the task through the OSA procedure, with fewer inactive lever presses across the different protocols. The W rats pressing the inactive lever significantly less is mainly due to less presses overall than the other strain. Results are expressed as a mean ± SEM of the number of presses on the inactive lever. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 *versus* W. #p<0.05, ###p<0.001 *versus* SD.



Supplemental figure 3: Differences in response to ethanol in LE rats. (A) Long-term synaptic depression is abolished 48h after ethanol binges in 6 slices recorded from 4 animals. (B) Long-term depression is unaffected after ethanol binges in 3 slices recorded from 2 animals. n is the number of slices and N the number of animals. Overall, two-third of LE slices were sensitive to ethanol and showed an abolition of LTD.



Supplemental figure 4: Blood ethanol concentration. Naïve SD, W and LE rats received an i.p. injection of an ethanol solution (20% v/v, 3 g/kg) and blood samples were collected from the sublingual vein 30 and 240 min after injection. A) Blood ethanol concentrations are expressed as Mean ± SEM expressed in mg/dL. n = 5 in each group. ***: $p < 0.001$ *vs.* SD and *vs.* W; ###: $p < 0.001$ between 30 and 240 min within each strain. B) Decrease in BEC within strains between the 30 min and the 240 min timepoint blood collection. N = 5 in each group. ***: $p < 0.001$.

RÉFÉRENCES

Abraham WC, Williams JM (2003) Properties and mechanisms of LTP maintenance. Neuroscientist 9:463–474. https://doi.org/10.1177/1073858403259119

Abrahao KP, Ariwodola OJ, Butler TR, et al (2013) Locomotor sensitization to ethanol impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the nucleus accumbens and increases ethanol self-administration. J Neurosci 33:4834–4842. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5839-11.2013

Acheson SK, Ross EL, Swartzwelder HS (2001) Age-independent and dose-response effects of ethanol on spatial memory in rats. Alcohol 23:167–175. https://doi.org/10.1016/s0741-8329(01)00127-6

Agrawal RG, Hewetson A, George CM, et al (2011) Minocycline reduces ethanol drinking. Brain Behav Immun 25 Suppl 1:S165-169. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.002

Agudelo M, Gandhi N, Saiyed Z, et al (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

Ahmad Ganai S, Ramadoss M, Mahadevan V (2016) Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - Emerging Roles in Neuronal Memory, Learning, Synaptic Plasticity and Neural Regeneration. Curr Neuropharmacol 14:55–71. https://doi.org/10.2174/1570159X13666151021111609

Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, et al (2006) The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. Behav Brain Res 167:183–195. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.09.005

Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, et al (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. Journal of Comparative Neurology 347:150–160. https://doi.org/10.1002/cne.903470112

Al Ameri M, Al Mansouri S, Al Maamari A, Bahi A (2014) The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid reduces ethanol consumption and ethanol-conditioned place preference in rats. Brain Res 1583:122–131. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.07.051

Alati R, Al Mamun A, Williams GM, et al (2006) In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: a birth cohort study. Arch Gen Psychiatry 63:1009–1016. https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.9.1009

Alaux-Cantin S, Warnault V, Legastelois R, et al (2013) Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. Neuropharmacology 67:521–531. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.007

Albensi BC, Mattson MP (2000) Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. Synapse 35:151–159. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(200002)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P

Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, et al (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. J Neurosci 30:8285–8295. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010

Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. Science 362:181–185. https://doi.org/10.1126/science.aat0473

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. Proc Natl Acad Sci U S A 51:786–794. https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786

Ambrogi Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, et al (1997) Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. Brain Res 768:242–248. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00651-3

An L, Sun W (2017) Prenatal melamine exposure impairs spatial cognition and hippocampal synaptic plasticity by presynaptic and postsynaptic inhibition of glutamatergic transmission in adolescent offspring. Toxicol Lett 269:55–64. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.005

Andler R, Richard J-B, Palle C, et al (2019) [Alcohol consumption in France in 2017]. Rev Prat 69:886–891

Artola A, Bröcher S, Singer W (1990) Different voltage-dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. Nature 347:69–72. https://doi.org/10.1038/347069a0

Atkinson RC, Shiffrin RM (1968) Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. In: Spence KW, Spence JT (eds) Psychology of Learning and Motivation. Academic Press, pp 89–195

Avital A, Goshen I, Kamsler A, et al (2003) Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. Hippocampus 13:826–834. https://doi.org/10.1002/hipo.10135

Baddeley A (2010) Working memory. Current Biology 20:R136–R140. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.014

Bagchi RA, Weeks KL (2019) Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases. J Mol Cell Cardiol 130:151–159. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.04.003

Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, et al (2012) HDAC1 regulates fear extinction in mice. J Neurosci 32:5062–5073. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0079-12.2012

Baier PC, May U, Scheller J, et al (2009) Impaired hippocampus-dependent and -independent learning in IL-6 deficient mice. Behav Brain Res 200:192–196. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.013

Bajo M, Montgomery SE, Cates LN, et al (2016) Evaluation of TLR4 Inhibitor, T5342126, in Modulation of Ethanol-Drinking Behavior in Alcohol-Dependent Mice. Alcohol Alcohol 51:541–548. https://doi.org/10.1093/alcalc/agw026

Balschun D, Wetzel W, Del Rey A, et al (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget. FASEB J 18:1788–1790. https://doi.org/10.1096/fj.04-1625fje

Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK (2019) Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. Neurochem Res 44:281–296. https://doi.org/10.1007/s11064-018-2695-4

Banke TG, Bowie D, Lee H-K, et al (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

Baradaran Z, Vakilian A, Zare M, et al (2021) Metformin improved memory impairment caused by chronic ethanol consumption during adolescent to adult period of rats: Role of oxidative stress and neuroinflammation. Behav Brain Res 411:113399. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113399

Barker TH, George RP, Howarth GS, Whittaker AL (2017) Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare. PLoS One 12:e0185135. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185135

Barrett RM, Malvaez M, Kramar E, et al (2011) Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. Neuropsychopharmacology 36:1545–1556. https://doi.org/10.1038/npp.2011.61

Batmunkh M, Bugay A, Bayarchimeg L, Lkhagva O (2018) Radiation Damage to Nervous System: Designing Optimal Models for Realistic Neuron Morphology in Hippocampus. EPJ Web Conf 173:05004. https://doi.org/10.1051/epjconf/201817305004

Baune BT, Wiede F, Braun A, et al (2008) Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B:1056–1064. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30712

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, et al (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. Science 295:2282–2285. https://doi.org/10.1126/science.1067859

Bedendo A, Andrade ALM, Opaleye ES, Noto AR (2017) Binge drinking: a pattern associated with a risk of problems of alcohol use among university students 1. Rev Lat Am Enfermagem 25:e2925. https://doi.org/10.1590/1518-8345.1891.2925

Bellinger FP, Madamba S, Siggins GR (1993) Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. Brain Res 628:227–234. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90959-q

Bellinger FP, Madamba SG, Campbell IL, Siggins GR (1995) Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of transgenic mice with cerebral overexpression of interleukin-6. Neurosci Lett 198:95–98. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11976-4

Bell-Temin H, Zhang P, Chaput D, et al (2013) Quantitative proteomic characterization of ethanol-responsive pathways in rat microglial cells. J Proteome Res 12:2067–2077. https://doi.org/10.1021/pr301038f

Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, et al (2003) Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. Mol Cell Neurosci 24:623–631. https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00218-5

Bertani I, Iori V, Trusel M, et al (2017) Inhibition of IL-1β Signaling Normalizes NMDA-Dependent Neurotransmission and Reduces Seizure Susceptibility in a Mouse Model of Creutzfeldt-Jakob Disease. J Neurosci 37:10278–10289. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1301-17.2017

Bertrand C, Deschamps C, Rabiant K, et al (2021) Patch-Clamp Recording of Low Frequency Stimulation-induced Long-Term Synaptic Depression in Rat Hippocampus Slices During Early and Late Neurodevelopment. Alcohol Clin Exp Res 45:351–364. https://doi.org/10.1111/acer.14516

Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory." Nat Protoc 1:1306–1311. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205

Bhargava P, Smith MD, Mische L, et al (2020) Bile acid metabolism is altered in multiple sclerosis and supplementation ameliorates neuroinflammation. J Clin Invest 130:3467–3482. https://doi.org/10.1172/JCI129401

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. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.02-01-00032.1982

Bjugstad KB, Flitter WD, Garland WA, et al (1998) Preventive actions of a synthetic antioxidant in a novel animal model of AIDS dementia. Brain Res 795:349–357. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00351-5

Blanco AM, Vallés SL, Pascual M, Guerri C (2005) Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. J Immunol 175:6893–6899. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6893

Bliss TV, 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 (Lond) 232:331–356

Blitzer RD, Gil O, Landau EM (1990) Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. Brain Research 537:203–208. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90359-J

Blokland A, Prickaerts J, Raaijmakers W (1993) Absence of impairments in spatial and temporal discrimination learning in Lewis rats after chronic ethanol consumption. Pharmacol Biochem Behav 46:27–34. https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90312-h

Bohnsack JP, Hughes BA, O'Buckley TK, et al (2018) Histone deacetylases mediate GABAA receptor expression, physiology, and behavioral maladaptations in rat models of alcohol dependence. Neuropsychopharmacology 43:1518–1529. https://doi.org/10.1038/s41386-018-0034-8

Bonaldi C, Hill C (2019) La mortalité attribuable à l'alcool en France en 2015. Bull Epidémiol Hebd (5-6):97-108:12

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047527

Boulouard M, Lelong V, Daoust M, Naassila M (2002) Chronic ethanol consumption induces tolerance to the spatial memory impairing effects of acute ethanol administration in rats. Behavioural Brain Research 136:239–246. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00134-1

Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, et al (2003) A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10518–10522. https://doi.org/10.1073/pnas.1834280100

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, et al (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. Cell 79:59–68. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90400-6

Bousiges O, Vasconcelos AP de, Neidl R, et 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. https://doi.org/10.1038/npp.2010.117

Boyadjieva NI, Sarkar DK (2010) Role of microglia in ethanol's apoptotic action on hypothalamic neuronal cells in primary cultures. Alcohol Clin Exp Res 34:1835–1842. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01271.x

Branchi I, Ricceri L (2013) Active and passive avoidance. In: Sluyter F, Gerlai RT, Pietropaolo S, Crusio WE (eds) Behavioral Genetics of the Mouse: Volume 1: Genetics of Behavioral Phenotypes. Cambridge University Press, Cambridge, pp 291–298

Brigman JL, Wright T, Talani G, et al (2010) Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. J Neurosci 30:4590–4600. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010

Broadwater M, Spear LP (2013) Consequences of ethanol exposure on cued and contextual fear conditioning and extinction differ depending on timing of exposure during adolescence or adulthood. Behav Brain Res 256:10–19. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.013

Broadwater MA, Liu W, Crews FT, Spear LP (2014) Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. Dev Neurosci 36:297–305. https://doi.org/10.1159/000362874

Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, et al (2007) Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. J Mol Neurosci 31:47–58. https://doi.org/10.1007/BF02686117

Brown SA, Tapert SF, Granholm E, Delis DC (2000) Neurocognitive functioning of adolescents: effects of protracted alcohol use. Alcohol Clin Exp Res 24:164–171

Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN (2004) Dissection of tumor-necrosis factor-alpha inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. Neuroscience 124:319–326. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.11.040

Caputi FF, Palmisano M, D'Addario C, et al (2015) Effects of acute ethanol exposure on class I HDACs family enzymes in wild-type and BDNF(+/-) mice. Drug Alcohol Depend 155:68–75. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.08.015

Caracciolo L, Barbon A, Palumbo S, et al (2011) Altered mRNA editing and expression of ionotropic glutamate receptors after kainic acid exposure in cyclooxygenase-2 deficient mice. PLoS One 6:e19398. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019398

Carbia C, Cadaveira F, Caamaño-Isorna F, et al (2017) Binge drinking during adolescence and young adulthood is associated with deficits in verbal episodic memory. PLoS One 12:e0171393. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171393

Carson MJ, Thrash JC, Walter B (2006) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. Clin Neurosci Res 6:237–245. https://doi.org/10.1016/j.cnr.2006.09.004

Cerbai F, Lana D, Nosi D, et al (2012) The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. PLoS One 7:e45250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045250

Chatterjee S, Cassel R, Schneider-Anthony A, et al (2018) Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. EMBO Mol Med 10:e8587. https://doi.org/10.15252/emmm.201708587

Chen C, Magee JC, Bazan NG (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. J Neurophysiol 87:2851–2857. https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.2851

Chen W-W, Zhang X, Huang W-J (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). Mol Med Rep 13:3391–3396. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948

Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al (2013) Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. Brain Behav Immun 32:70–85. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.005

Chin VS, Van Skike CE, Berry RB, et al (2011) Effect of acute ethanol and acute allopregnanolone on spatial memory in adolescent and adult rats. Alcohol 45:473–483. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.03.001

Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, et al (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. Nature 379:78–81. https://doi.org/10.1038/379078a0

Clark RE, Martin SJ (2005) Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. Curr Opin Neurobiol 15:593–598. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.014

Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000) Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. J Neurosci 20:8853–8860. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08853.2000

Clarke VR, Ballyk BA, Hoo KH, et al (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. Nature 389:599–603. https://doi.org/10.1038/39315

Clayton NS, Bussey TJ, Dickinson A (2003) Can animals recall the past and plan for the future? Nat Rev Neurosci 4:685–691. https://doi.org/10.1038/nrn1180

Cohen SJ, Munchow AH, Rios LM, et al (2013) The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. Curr Biol 23:1685–1690. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002

Coleman LG, He J, Lee J, et al (2011) Adolescent binge drinking alters adult brain neurotransmitter gene expression, behavior, brain regional volumes, and neurochemistry in mice. Alcohol Clin Exp Res 35:671–688. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01385.x

Coleman LG, Zou J, Crews FT (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. J Neuroinflammation 14:22. https://doi.org/10.1186/s12974-017-0799-4

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. J Physiol 334:33–46. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478

Colombo M, Fernandez T, Nakamura K, Gross CG (1998) Functional Differentiation Along the Anterior-Posterior Axis of the Hippocampus in Monkeys. Journal of Neurophysiology 80:1002–1005. https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.2.1002

Contreras A, Polín E, Miguéns M, et al (2019) Intermittent-Excessive and Chronic-Moderate Ethanol Intake during Adolescence Impair Spatial Learning, Memory and Cognitive Flexibility in the Adulthood. Neuroscience 418:205–217. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.051

Coogan AN, O'Neill LA, O'Connor JJ (1999) The P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1beta on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. Neuroscience 93:57–69. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00100-1

Courtney KE, Polich J (2009) Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants. Psychol Bull 135:142–156. https://doi.org/10.1037/a0014414

Cowley TR, Fahey B, O'Mara SM (2008) COX-2, but not COX-1, activity is necessary for the induction of perforant path long-term potentiation and spatial learning in vivo. Eur J Neurosci 27:2999–3008. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06251.x

Crego A, Rodriguez-Holguín S, Parada M, et al (2010) Reduced anterior prefrontal cortex activation in young binge drinkers during a visual working memory task. Drug Alcohol Depend 109:45–56. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.11.020

Crews FT, Lawrimore CJ, Walter TJ, Coleman LG (2017) The role of neuroimmune signaling in alcoholism. Neuropharmacology 122:56–73. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.031

Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, et al (2006) Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. Neuroscience 137:437–445. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.090

Cruz C, Meireles M, Silva SM (2017) Chronic ethanol intake induces partial microglial activation that is not reversed by long-term ethanol withdrawal in the rat hippocampal formation. Neurotoxicology 60:107–115. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.04.005

Cunningham AJ, Murray CA, O'Neill LA, et al (1996) Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. Neurosci Lett 203:17–20. https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12252-4

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65:1–105. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8

Davie JR (1997) Nuclear matrix, dynamic histone acetylation and transcriptionally active chromatin. Mol Biol Rep 24:197–207. https://doi.org/10.1023/a:1006811817247

De Bellis MD, Clark DB, Beers SR, et al (2000) Hippocampal Volume in Adolescent-Onset Alcohol Use Disorders. AJP 157:737–744. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.5.737

de Mendonça A, Ribeiro JA (2000) Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A1 receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. Neurosci Lett 291:81–84. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01391-4

Deitrich RA, Harris RA (1996) How much alcohol should I use in my experiments? Alcohol Clin Exp Res 20:1–2. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01033.x

Desai A (2010) Governments confront drunken violence. Bull World Health Organ 88:644–645. https://doi.org/10.2471/BLT.10.010910

D'Hooge R, Lüllmann-Rauch R, Beckers T, et al (2005) Neurocognitive and psychotiform behavioral alterations and enhanced hippocampal long-term potentiation in transgenic mice displaying neuropathological features of human alpha-mannosidosis. J Neurosci 25:6539–6549. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0283-05.2005

Dilekoz E, Houben T, Eikermann-Haerter K, et al (2015) Migraine mutations impair hippocampal learning despite enhanced long-term potentiation. J Neurosci 35:3397–3402. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2630-14.2015

DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. J Neurochem 139 Suppl 2:136–153. https://doi.org/10.1111/jnc.13607

Doremus-Fitzwater TL, Buck HM, Bordner K, et al (2014) Intoxication- and withdrawal-dependent expression of central and peripheral cytokines following initial ethanol exposure. Alcohol Clin Exp Res 38:2186–2198. https://doi.org/10.1111/acer.12481

Doremus-Fitzwater TL, Gano A, Paniccia JE, Deak T (2015) Male adolescent rats display blunted cytokine responses in the CNS after acute ethanol or lipopolysaccharide exposure. Physiol Behav 148:131–144. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.032

Drissi I, Deschamps C, Alary R, et al (2021) Role of heat shock transcription factor 2 in the NMDA-dependent neuroplasticity induced by chronic ethanol intake in mouse hippocampus. Addict Biol 26:e12939. https://doi.org/10.1111/adb.12939

Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. PNAS 89:4363–4367. https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4363

Dunwiddie T, Madison D, Lynch G (1978) Synaptic transmission is required for initiation of long-term potentiation. Brain Res 150:413–417. https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90293-7

Ebada ME, Latif LM, Kendall DA, Pardon M-C (2014) Corticosterone protects against memory impairments and reduced hippocampal BDNF levels induced by a chronic low dose of ethanol in C57BL/6J mice

Ehrlich D, Pirchl M, Humpel C (2012) Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. Neuroscience 205:154–166. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.054

Eichenbaum H, Stewart C, Morris RG (1990) Hippocampal representation in place learning. J Neurosci 10:3531–3542

English JD, Sweatt JD (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

Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res 31:47–59. https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x

Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, et al (2001) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. J Neurosci 21:6423–6429

Faraco G, Pittelli M, Cavone L, et al (2009) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response in vitro and in vivo. Neurobiol Dis 36:269–279. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.019

Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol 28:138–145. https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005

Felice C, Lewis A, Armuzzi A, et al (2015) Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. Aliment Pharmacol Ther 41:26–38. https://doi.org/10.1111/apt.13008

Fernandez GM, Savage LM (2017) Adolescent binge ethanol exposure alters specific forebrain cholinergic cell populations and leads to selective functional deficits in the prefrontal cortex. Neuroscience 361:129–143. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.013

Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. J Immunol 183:4733–4744. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803590

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, et al (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature 401:188–193. https://doi.org/10.1038/43710

Fiore M, Probert L, Kollias G, et al (1996) Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF-alpha in the brain. Brain Behav Immun 10:126–138. https://doi.org/10.1006/brbi.1996.0013

Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, et al (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. Nature 447:178–182. https://doi.org/10.1038/nature05772

Fischer G, Mutel V, Trube G, et al (1997) Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. J Pharmacol Exp Ther 283:1285–1292

Fontaine CJ, Pinar C, Yang W, et al (2019) Impaired Bidirectional Synaptic Plasticity in Juvenile Offspring Following Prenatal Ethanol Exposure. Alcohol Clin Exp Res 43:2153–2166. https://doi.org/10.1111/acer.14170

Fox CJ, Russell KI, Wang YT, Christie BR (2006) Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. Hippocampus 16:907–915. https://doi.org/10.1002/hipo.20230

Fujita Y, Morinobu S, Takei S, et al (2012) Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. Journal of Psychiatric Research 46:635–643. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.01.026

Galliano E, Potters J-W, Elgersma Y, et al (2013) Synaptic transmission and plasticity at inputs to murine cerebellar Purkinje cells are largely dispensable for standard nonmotor tasks. J Neurosci 33:12599–12618. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1642-13.2013

Garcia-Alvarez G, Shetty MS, Lu B, et al (2015) Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes. Front Behav Neurosci 9:180. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00180

García-Moreno LM, Cimadevilla JM (2012) Acute and chronic ethanol intake: effects on spatial and non-spatial memory in rats. Alcohol 46:757–762. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2012.08.001

Gardner KE, Allis CD, Strahl BD (2011) Operating on chromatin, a colorful language where context matters. J Mol Biol 409:36–46. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.040

Ge Y, Dong Z, Bagot RC, et al (2010) Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. Proc Natl Acad Sci USA 107:16697–16702. https://doi.org/10.1073/pnas.1008200107

Gerace E, Ilari A, Caffino L, et al (2021) Ethanol neurotoxicity is mediated by changes in expression, surface localization and functional properties of glutamate AMPA receptors. J Neurochem 157:2106–2118. https://doi.org/10.1111/jnc.15223

Gerber J, Böttcher T, Hahn M, et al (2004) Increased mortality and spatial memory deficits in TNF-alpha-deficient mice in ceftriaxone-treated experimental pneumococcal meningitis. Neurobiol Dis 16:133–138. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.013

Giedd JN (2004) Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. Ann N Y Acad Sci 1021:77–85. https://doi.org/10.1196/annals.1308.009

Gierski F, Stefaniak N, Benzerouk F, et al (2020) Component process analysis of verbal memory in a sample of students with a binge drinking pattern. Addict Behav Rep 12:100323. https://doi.org/10.1016/j.abrep.2020.100323

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330:841–845. https://doi.org/10.1126/science.1194637

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, et al (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8174–8179. https://doi.org/10.1073/pnas.0402680101

Golan H, Levav T, Mendelsohn A, Huleihel M (2004) Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function. Cereb Cortex 14:97–105. https://doi.org/10.1093/cercor/bhg108

Gonda X (2012) Basic pharmacology of NMDA receptors. Curr Pharm Des 18:1558–1567. https://doi.org/10.2174/138161212799958521

Gonzales C, Zaleska MM, Riddell DR, et al (2014) Alternative method of oral administration by peanut butter pellet formulation results in target engagement of BACE1 and attenuation of gavage-induced stress responses in mice. Pharmacol Biochem Behav 126:28–35. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.010

González-Quintela A, Dominguez-Santalla MJ, Pérez LF, et al (2000) Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. Cytokine 12:1437–1440. https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0715

Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y (2017) Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. Neurosci Biobehav Rev 77:14–31. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.024

Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, et al (2007) A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. Psychoneuroendocrinology 32:1106–1115. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.09.004

Gräff J, Rei D, Guan J-S, et al (2012) An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. Nature 483:222–226. https://doi.org/10.1038/nature10849

Gräff J, Tsai L-H (2013) Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. Nat Rev Neurosci 14:97–111. https://doi.org/10.1038/nrn3427

Gronier B, Savignac HM, Di Miceli M, et al (2018) Increased cortical neuronal responses to NMDA and improved attentional set-shifting performance in rats following prebiotic (B-GOS®) ingestion. Eur Neuropsychopharmacol 28:211–224. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.11.001

Guan J-S, Haggarty SJ, Giacometti E, et al (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. Nature 459:55–60. https://doi.org/10.1038/nature07925

Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, et al (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. Cell 111:483–493. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01074-7

Guo W, Crossey EL, Zhang L, et al (2011) Alcohol exposure decreases CREB binding protein expression and histone acetylation in the developing cerebellum. PLoS One 6:e19351. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019351

Haber M, James J, Kim J, et al (2018) Minocycline plus N-acteylcysteine induces remyelination, synergistically protects oligodendrocytes and modifies neuroinflammation in a rat model of mild traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 38:1312–1326. https://doi.org/10.1177/0271678X17718106

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet 10:32–42. https://doi.org/10.1038/nrg2485

Halkidou K, Gaughan L, Cook S, et al (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. Prostate 59:177–189. https://doi.org/10.1002/pros.20022

Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, et al (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. J Gen Physiol 150:1081–1105. https://doi.org/10.1085/jgp.201812032

Hanson KL, Medina KL, Padula CB, et al (2011) Impact of Adolescent Alcohol and Drug Use on Neuropsychological Functioning in Young Adulthood: 10-Year Outcomes. J Child Adolesc Subst Abuse 20:135–154. https://doi.org/10.1080/1067828X.2011.555272

Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. Annu Rev Neurosci 17:341–371. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.002013

He J, Crews FT (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. Exp Neurol 210:349–358. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.017

Hebb DO (1949) The Organization of Behavior : A Neuropsychological Theory

Heberlein A, Käser M, Lichtinghagen R, et al (2014) TNF-α and IL-6 serum levels: neurobiological markers of alcohol consumption in alcohol-dependent patients? Alcohol 48:671–676. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.08.003

Hedden SL, Kennet J, Lipari R, et al (2015) Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2015 National Survey on Drug Use and Health. 74

Hefner K, Holmes A (2007) An investigation of the behavioral actions of ethanol across adolescence in mice. Psychopharmacology (Berl) 191:311–322. https://doi.org/10.1007/s00213-006-0646-2

Heginbotham LR, Dunwiddie TV (1991) Long-term increases in the evoked population spike in the CA1 region of rat hippocampus induced by beta-adrenergic receptor activation. J Neurosci 11:2519–2527

Hein AM, Stutzman DL, Bland ST, et al (2007) Prostaglandins are necessary and sufficient to induce contextual fear learning impairments after interleukin-1 beta injections into the dorsal hippocampus. Neuroscience 150:754–763. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.003

Hendricson AW, Miao CLA, Lippmann MJ, Morrisett RA (2002) Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression. J Pharmacol Exp Ther 301:938–944

Henniger MSH, Wotjak CT, Hölter SM (2003) Long-term voluntary ethanol drinking increases expression of NMDA receptor 2B subunits in rat frontal cortex. Eur J Pharmacol 470:33–36. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01787-4

Hingson RW, Heeren T, Winter MR (2006) Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. Arch Pediatr Adolesc Med 160:739–746. https://doi.org/10.1001/archpedi.160.7.739

Hingson RW, Zha W, Weitzman ER (2009) Magnitude of and trends in alcohol-related mortality and morbidity among U.S. college students ages 18-24, 1998-2005. J Stud Alcohol Drugs Suppl 12–20. https://doi.org/10.15288/jsads.2009.s16.12

Hryniewicz A, Bialuk I, Kamiński KA, Winnicka MM (2007) Impairment of recognition memory in interleukin-6 knock-out mice. Eur J Pharmacol 577:219–220. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.046

Hsing C-H, Hung S-K, Chen Y-C, et al (2015) Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Ameliorated Endotoxin-Induced Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction. Mediators Inflamm 2015:163140. https://doi.org/10.1155/2015/163140

Hu XJ, Follesa P, Ticku MK (1996) Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. Brain Res Mol Brain Res 36:211–218. https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00223-f

Hua JPY, Sher KJ, Boness CL, et al (2020) Prospective Study Examining the Effects of Extreme Drinking on Brain Structure in Emerging Adults. Alcohol Clin Exp Res 44:2200–2211. https://doi.org/10.1111/acer.14446

Hwang J-W, Jeon Y-T, Lim Y-J, Park H-P (2017a) Sevoflurane Postconditioning-Induced Anti-Inflammation via Inhibition of the Toll-Like Receptor-4/Nuclear Factor Kappa B Pathway Contributes to Neuroprotection against Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. Int J Mol Sci 18:. https://doi.org/10.3390/ijms18112347

Hwang J-Y, Aromolaran KA, Zukin RS (2017b) The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. Nat Rev Neurosci 18:347–361. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.46

Ibrahim L, Diaz Granados N, Jolkovsky L, et al (2012) A Randomized, placebo-controlled, crossover pilot trial of the oral selective NR2B antagonist MK-0657 in patients with treatment-resistant major depressive disorder. J Clin Psychopharmacol 32:551–557. https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e31825d70d6

Ikegaya Y, Delcroix I, Iwakura Y, et al (2003) Interleukin-1beta abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. Synapse 47:54–57. https://doi.org/10.1002/syn.10154

Izumi Y, Kitabayashi R, Funatsu M, et al (2005a) A single day of ethanol exposure during development has persistent effects on bi-directional plasticity, N-methyl-D-aspartate receptor function and ethanol sensitivity. Neuroscience 136:269–279. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.015

Izumi Y, Murayama K, Tokuda K, et al (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

Izumi Y, Nagashima K, Murayama K, Zorumski CF (2005b) Acute effects of ethanol on hippocampal long-term potentiation and long-term depression are mediated by different mechanisms. Neuroscience 136:509–517. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.002

Jankowsky JL, Derrick BE, Patterson PH (2000) Cytokine responses to LTP induction in the rat hippocampus: a comparison of in vitro and in vivo techniques. Learn Mem 7:400–412. https://doi.org/10.1101/lm.32600

Jeanblanc J, Lemoine S, Jeanblanc V, et al (2015) The Class I-Specific HDAC Inhibitor MS-275 Decreases Motivation to Consume Alcohol and Relapse in Heavy Drinking Rats. Int J Neuropsychopharmacol 18:. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv029

Jeanblanc J, Rolland B, Gierski F, et al (2019) Animal models of binge drinking, current challenges to improve face validity. Neurosci Biobehav Rev 106:112–121. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.002

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. Science 293:1074–1080. https://doi.org/10.1126/science.1063127

Jeon D, Song I, Guido W, et al (2008) Ablation of Ca2+ channel beta3 subunit leads to enhanced N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation and improved long term memory. J Biol Chem 283:12093–12101. https://doi.org/10.1074/jbc.M800816200

Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, et al (2007) Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. Alcohol Clin Exp Res 31:486–492. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00329.x

Jurado S, Goswami D, Zhang Y, et al (2013) LTP Requires a Unique Postsynaptic SNARE Fusion Machinery. Neuron 77:542–558. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.029

Kalinski P (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol 188:21–28. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029

Kalluri HS, Mehta AK, Ticku MK (1998) Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. Brain Res Mol Brain Res 58:221–224

Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, et al (2010) Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. Science 328:1709–1712. https://doi.org/10.1126/science.1187801

Kelly A, Lynch A, Vereker E, et al (2001) The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. J Biol Chem 276:45564–45572. https://doi.org/10.1074/jbc.M108757200

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

Kervern M, Silvestre de Ferron B, Alaux-Cantin S, et al (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

Kim B, Jha S, Seo JH, et al (2020) MeBib Suppressed Methamphetamine Self-Administration Response via Inhibition of BDNF/ERK/CREB Signal Pathway in the Hippocampus. Biomol Ther (Seoul) 28:519–526. https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.041

Kim H-S, Suh Y-H (2009) Minocycline and neurodegenerative diseases. Behav Brain Res 196:168–179. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.040

Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science 256:675–677. https://doi.org/10.1126/science.1585183

Kim M-S, Akhtar MW, Adachi M, et al (2012) An essential role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation. J Neurosci 32:10879–10886. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2089-12.2012

Kim Y-K, Na K-S, Myint A-M, Leonard BE (2016) The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 64:277–284. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008

Koo JW, Duman RS (2008) IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. Proc Natl Acad Sci U S A 105:751–756. https://doi.org/10.1073/pnas.0708092105

Koob GF (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. Handb Clin Neurol 125:33–54. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62619-6.00003-3

Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. Annu Rev Biochem 46:931–954. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.004435

Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. Neuron 42:961–972. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.002

Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. Cell 128:693–705. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005

Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z (2019) The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. Methods Mol Biol 1916:105–111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10

Kristensen AS, Jenkins MA, Banke TG, et al (2011) Mechanism of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. Nat Neurosci 14:727–735. https://doi.org/10.1038/nn.2804

Kumar V (2019) Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. J Neuroimmunol 332:16–30. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012

Kuntsche E, Sznitman SR, Kuntsche S (2017) Alcohol and other substance use in a cross-cultural perspective. Drug Alcohol Rev 36:717–720. https://doi.org/10.1111/dar.12625

Kuo MH, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays 20:615–626. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H

Kwon HS, Koh S-H (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Transl Neurodegener 9:42. https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2

Labrousse VF, Costes L, Aubert A, et al (2009) Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice. PLoS One 4:e6006. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006006

Laflamme N, Lacroix S, Rivest S (1999) An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. J Neurosci 19:10923–10930

Larson J, Munkácsy E (2015) Theta-burst LTP. Brain Res 1621:38–50. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.034

Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. Cell 72:73–84. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90051-q

Lee SH, Liu L, Wang YT, 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

Lee V, Maguire J (2014) The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. Front Neural Circuits 8:3. https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00003

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. https://doi.org/10.1111/acer.12088

Lerma J (2006) Kainate receptor physiology. Curr Opin Pharmacol 6:89–97. https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.08.004

Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, et al (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 AJ, Katafuchi T, Oda S, et al (1997) Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. Brain Res 748:30–38. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01283-8

Li D, Zhang Y, Zhang Y, et al (2019a) Correlation between the epigenetic modification of histone H3K9 acetylation of NR2B gene promoter in rat hippocampus and ethanol withdrawal syndrome. Mol Biol Rep 46:2867–2875. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04733-7

Li H, Weiss SRB, Chuang D-M, et al (1998) Bidirectional Synaptic Plasticity in the Rat Basolateral Amygdala: Characterization of an Activity-Dependent Switch Sensitive to the Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptor Antagonist 2S-α-Ethylglutamic Acid. J Neurosci 18:1662–1670. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-05-01662.1998

Li Q, Liu D, Pan F, et al (2019b) Ethanol Exposure Induces Microglia Activation and Neuroinflammation through TLR4 Activation and SENP6 Modulation in the Adolescent Rat Hippocampus. Neural Plast 2019:1648736. https://doi.org/10.1155/2019/1648736

Liang M, Zhong H, Rong J, et al (2019) Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Impairs Adult Neurogenesis and Causes Depression-like Behaviors Through Astrocytes Activation Triggering GABAA Receptor Downregulation. Neuroscience 422:21–31. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.025

Lin D-T, Makino Y, Sharma K, et al (2009) Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. Nat Neurosci 12:879–887. https://doi.org/10.1038/nn.2351

Lisdahl KM, Thayer R, Squeglia LM, et al (2013) Recent binge drinking predicts smaller cerebellar volumes in adolescents. Psychiatry Res 211:17–23. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2012.07.009

Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat Rev Neurosci 3:175–190. https://doi.org/10.1038/nrn753

Liu L, Zhang S, Zhu Y, et al (2007) Improved learning and memory of contextual fear conditioning and hippocampal CA1 long-term potentiation in histidine decarboxylase knock-out mice. Hippocampus 17:634–641. https://doi.org/10.1002/hipo.20305

Liu Y, Zhang Y, Zheng X, et al (2018) Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. J Neuroinflammation 15:112. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1141-5

Livy DJ, Parnell SE, West JR (2003) Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. Alcohol 29:165–171. https://doi.org/10.1016/s0741-8329(03)00025-9

Loane DJ, Kumar A (2016) Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. Exp Neurol 275 Pt 3:316–327. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.018

Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, et al (1996) Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. Brain Res 730:32–39. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00427-1

Loscher CE, Mills KHG, Lynch MA (2003) Interleukin-1 receptor antagonist exerts agonist activity in the hippocampus independent of the interleukin-1 type I receptor. J Neuroimmunol 137:117–124. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(03)00072-9

Loss CM, da Rosa NS, Mestriner RG, et al (2019) Blockade of GluN2B-containing NMDA receptors reduces short-term brain damage induced by early-life status epilepticus. Neurotoxicology 71:138–149. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.01.002

Lovinger DM, White G, Weight FF (1990) NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. J Neurosci 10:1372–1379. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-04-01372.1990

Lovinger DM, White G, Weight FF (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. Science 243:1721–1724. https://doi.org/10.1126/science.2467382

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, et al (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389:251–260. https://doi.org/10.1038/38444

Lukoyanov NV, Brandão F, Cadete-Leite A, et al (2000) Synaptic reorganization in the hippocampal formation of alcohol-fed rats may compensate for functional deficits related to neuronal loss. Alcohol 20:139–148. https://doi.org/10.1016/s0741-8329(99)00069-5

Luo F, Hu Y, Zhao W, et al (2016) Maternal Exposure of Rats to Isoflurane during Late Pregnancy Impairs Spatial Learning and Memory in the Offspring by Up-Regulating the Expression of Histone Deacetylase 2. PLoS One 11:e0160826. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160826

Lüthi A, Wikström MA, Palmer MJ, et al (2004) Bi-directional modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. BMC Neurosci 5:44. https://doi.org/10.1186/1471-2202-5-44

Lyman M, Lloyd DG, Ji X, et al (2014) Neuroinflammation: the role and consequences. Neurosci Res 79:1–12. https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.004

Lynch G, Larson J, Kelso S, et al (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. Nature 305:719–721. https://doi.org/10.1038/305719a0

Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. Nature 266:737–739. https://doi.org/10.1038/266737a0

Lynch MA (2004) Long-Term Potentiation and Memory. Physiological Reviews 84:87–136. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003

Ma TC, Zhu XZ (2000) Effects of intrahippocampal infusion of interleukin-6 on passive avoidance and nitrite and prostaglandin levels in the hippocampus in rats. Arzneimittelforschung 50:227–231. https://doi.org/10.1055/s-0031-1300190

Maggio N, Segal M (2011) Persistent changes in ability to express long-term potentiation/depression in the rat hippocampus after juvenile/adult stress. Biol Psychiatry 69:748–753. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.11.026

Maggio N, Vlachos A (2018) Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. J Mol Med (Berl) 96:1039–1047. https://doi.org/10.1007/s00109-018-1674-1

Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, et al (1998) Knowing where and getting there: a human navigation network. Science 280:921–924

Maler JM, Esselmann H, Wiltfang J, et al (2005) Memantine inhibits ethanol-induced NMDA receptor up-regulation in rat hippocampal neurons. Brain Res 1052:156–162. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.017

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

Marshall SA, Casachahua JD, Rinker JA, et al (2016) IL-1 receptor signaling in the basolateral amygdala modulates binge-like ethanol consumption in male C57BL/6J mice. Brain Behav Immun 51:258–267. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.006

Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, et al (2013) Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. Neurobiol Dis 54:239–251. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.016

Maurage P, Lannoy S, Mange J, et al (2020) What We Talk About When We Talk About Binge Drinking: Towards an Integrated Conceptualization and Evaluation. Alcohol Alcohol 55:468–479. https://doi.org/10.1093/alcalc/agaa041

McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, et al (1999) Cytokines in alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 19:205–219. https://doi.org/10.1055/s-2007-1007110

McClain CJ, Cohen DA (1989) Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. Hepatology 9:349–351. https://doi.org/10.1002/hep.1840090302

McClain JA, Morris SA, Deeny MA, et al (2011) Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. Brain Behav Immun 25 Suppl 1:S120-128. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.006

McClintick JN, Xuei X, Tischfield JA, et al (2013) Stress-response pathways are altered in the hippocampus of chronic alcoholics. Alcohol 47:505–515. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.07.002

McGuier NS, Padula AE, Mulholland PJ, Chandler LJ (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

McManus CM, Liu JS, Hahn MT, et al (2000) Differential induction of chemokines in human microglia by type I and II interferons. Glia 29:273–280

McQueeny T, Schweinsburg BC, Schweinsburg AD, et al (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 SC, Barrett RM, Matheos DP, et al (2011) HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. J Neurosci 31:764–774. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011

Medina KL, McQueeny T, Nagel BJ, et al (2008) Prefrontal Cortex Volumes in Adolescents With Alcohol Use Disorders: Unique Gender Effects. Alcohol Clin Exp Res 32:386–394. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00602.x

Menecier P, Rotheval L (2017) L'intoxication éthylique aiguë ou l'ivresse alcoolique. Médecine 13:261–265. https://doi.org/10.1684/med.2017.210

Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem J 404:1–13. https://doi.org/10.1042/BJ20070140

Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Andrew M, et al (2002) Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. Biol Psychiatry 52:1121–1133. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01439-7

Milner B, Corkin S, Teuber H-L (1968) Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M. Neuropsychologia 6:215–234. https://doi.org/10.1016/0028-3932(68)90021-3

Montesinos J, Gil A, Guerri C (2017) Nalmefene Prevents Alcohol-Induced Neuroinflammation and Alcohol Drinking Preference in Adolescent Female Mice: Role of TLR4. Alcohol Clin Exp Res 41:1257–1270. https://doi.org/10.1111/acer.13416

Montesinos J, Pascual M, Pla A, et al (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. Brain Behav Immun 45:233–244. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.015

Montesinos J, Pascual M, Rodríguez-Arias M, et al (2016) Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. Brain Behav Immun 53:159–171. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.12.006

Morean ME, L'Insalata A, Butler ER, et al (2018) Age at drinking onset, age at first intoxication, and delay to first intoxication: Assessing the concurrent validity of measures of drinking initiation

with alcohol use and related problems. Addict Behav 79:195–200. https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2017.12.017

Morita I (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins & other lipid mediators 68–69:. https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00029-1

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature 319:774–776. https://doi.org/10.1038/319774a0

Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K (2010) Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. Hippocampus 20:596–607. https://doi.org/10.1002/hipo.20665

Morrisett RA, Swartzwelder HS (1993) Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch- clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. J Neurosci 13:2264–2272. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-05-02264.1993

Mukherjee S, Manahan-Vaughan D (2013) Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. Neuropharmacology 66:65–81. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.005

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. Nature 369:486–488. https://doi.org/10.1038/369486a0

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An Essential Role for Protein Phosphatases in Hippocampal Long-Term Depression. Science 261:1051–1055. https://doi.org/10.1126/science.8394601

Murai KK, Nguyen LN, Irie F, et al (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. Nat Neurosci 6:153–160. https://doi.org/10.1038/nn994

Murray CA, Lynch MA (1998) Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. J Neurosci 18:2974–2981

Murray HJ, O'Connor JJ (2003) A role for COX-2 and p38 mitogen activated protein kinase in long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. Neuropharmacology 44:374–380. https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00375-1

Naassila M (2018) Bases neurobiologiques de l'addiction à l'alcool. La Presse Médicale 47:554–564. https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.12.001

Naderi Y, Sabetkasaei M, Parvardeh S, Moini Zanjani T (2017) Neuroprotective effects of pretreatment with minocycline on memory impairment following cerebral ischemia in rats. Behav Pharmacol 28:214–222. https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000297

Nagel BJ, Schweinsburg AD, Phan V, Tapert SF (2005) Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. Psychiatry Res 139:181–190. https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2005.05.008

Nakao K, Ikegaya Y, Yamada MK, et al (2002) Hippocampal long-term depression as an index of spatial working memory. Eur J Neurosci 16:970–974. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02159.x

Neyton J, Paoletti P (2006) Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. J Neurosci 26:1331–1333. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5242-05.2006

Nisticò R, Mango D, Mandolesi G, et al (2013) Inflammation subverts hippocampal synaptic plasticity in experimental multiple sclerosis. PLoS One 8:e54666. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054666

Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 50:295–322. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533

Nixon K, Crews FT (2004) Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. J Neurosci 24:9714–9722. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3063-04.2004

Nixon K, Kim DH, Potts EN, et al (2008) Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis. Neurobiol Dis 31:218–229. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.04.009

Nosyreva ED, Huber KM (2005) Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. J Neurosci 25:2992–3001. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3652-04.2005

Novier A, Van Skike CE, Chin VS, et al (2012) Low and moderate doses of acute ethanol do not impair spatial cognition but facilitate accelerating rotarod performance in adolescent and adult rats. Neurosci Lett 512:38–42. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.059

Novkovic T, Shchyglo O, Gold R, Manahan-Vaughan D (2015) Hippocampal function is compromised in an animal model of multiple sclerosis. Neuroscience 309:100–112. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.008

Nyberg L, McIntosh AR, Houle S, et al (1996) Activation of medial temporal structures during episodic memory retrieval. Nature 380:715–717. https://doi.org/10.1038/380715a0

Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT (2002) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. Pharmacol Biochem Behav 72:521–532. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00715-3

Ohshima T, Ogura H, Tomizawa K, et al (2005) Impairment of hippocampal long-term depression and defective spatial learning and memory in p35 mice. J Neurochem 94:917–925. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03233.x

Oike Y, Hata A, Mamiya T, et al (1999) Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. Hum Mol Genet 8:387–396. https://doi.org/10.1093/hmg/8.3.387

Oitzl MS, van Oers H, Schöbitz B, de Kloet ER (1993) Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. Brain Res 613:160–163. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90468-3

O'Keefe J, Conway DH (1978) Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. Exp Brain Res 31:573–590. https://doi.org/10.1007/BF00239813

Oliveira AMM, Wood MA, McDonough CB, Abel T (2007) Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. Learn Mem 14:564–572. https://doi.org/10.1101/lm.656907

Olton DS, Walker JA, Gage FH (1978) Hippocampal connections and spatial discrimination. Brain Res 139:295–308. https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90930-7

Paille F, Reynaud M (2015) L'alcool, une des toutes premières causes d'hospitalisation en France. Epidémiol Hebd 2015;(24-25):440-9

Pandey SC, Sakharkar AJ, Tang L, Zhang H (2015) Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood. Neurobiol Dis 82:607–619. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.019

Pandey SC, Ugale R, Zhang H, et al (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. J Neurosci 28:3729–3737. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nature Reviews Neuroscience 14:383–400. https://doi.org/10.1038/nrn3504

Parada M, Corral M, Caamaño-Isorna F, et al (2011) Binge drinking and declarative memory in university students. Alcohol Clin Exp Res 35:1475–1484. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01484.x

Park HG, Yu HS, Park S, et al (2014) Repeated treatment with electroconvulsive seizures induces HDAC2 expression and down-regulation of NMDA receptor-related genes through histone deacetylation in the rat frontal cortex. Int J Neuropsychopharmacol 17:1487–1500. https://doi.org/10.1017/S1461145714000248

Pascoli V, Terrier J, Espallergues J, et al (2014) Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. Nature 509:459–464. https://doi.org/10.1038/nature13257

Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, et al (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. Brain Behav Immun 25 Suppl 1:S80-91. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.012

Pascual M, Blanco AM, Cauli O, et al (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. Eur J Neurosci 25:541–550. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05298.x

Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, et al (2012) Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. Neuropharmacology 62:2309–2319. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.011

Pascual M, Montesinos J, Marcos M, et al (2017) Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. Addict Biol 22:1829–1841. https://doi.org/10.1111/adb.12461

Patterson M, Yasuda R (2011) Signalling pathways underlying structural plasticity of dendritic spines. Br J Pharmacol 163:1626–1638. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01328.x

Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press

Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neurosci Lett 565:30–38. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071

Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, et al (2017) Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. Physiol Rev 97:1619–1747. https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017

Pellerin L, Bouzier-Sore A-K, Aubert A, et al (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. Glia 55:1251–1262. https://doi.org/10.1002/glia.20528

Petit G, Kornreich C, Verbanck P, Campanella S (2013) Gender differences in reactivity to alcohol cues in binge drinkers: a preliminary assessment of event-related potentials. Psychiatry Res 209:494–503. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.04.005

Petrakis IL, Ralevski E, Gueorguieva R, et al (2019) Targeting neuroinflammation with minocycline in heavy drinkers. Psychopharmacology (Berl) 236:3013–3021. https://doi.org/10.1007/s00213-019-05205-3

Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci 106:274–285. https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274

Pinar C, Fontaine CJ, Triviño-Paredes J, et al (2017) Revisiting the flip side: Long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 80:394–413. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.001

Pribiag H, Stellwagen D (2013) TNF-α downregulates inhibitory neurotransmission through protein phosphatase 1-dependent trafficking of GABA(A) receptors. J Neurosci 33:15879–15893. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0530-13.2013

Pugh CR, Nguyen KT, Gonyea JL, et al (1999) Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. Behav Brain Res 106:109–118. https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00098-4

Pyapali GK, Turner DA, Wilson WA, Swartzwelder HS (1999) Age and Dose-Dependent Effects of Ethanol on the Induction of Hippocampal Long-Term Potentiation. Alcohol 19:107–111. https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00021-X

Qiang M, Denny A, Lieu M, et al (2011) Histone H3K9 modifications are a local chromatin event involved in ethanol-induced neuroadaptation of the NR2B gene. Epigenetics 6:1095–1104. https://doi.org/10.4161/epi.6.9.16924

Qiang M, Rani CSS, Ticku MK (2005) Neuron-restrictive silencer factor regulates the N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene in basal and ethanol-induced gene expression in fetal cortical neurons. Mol Pharmacol 67:2115–2125. https://doi.org/10.1124/mol.104.010751

Qin L, Crews FT (2012a) NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. J Neuroinflammation 9:5. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-5

Qin L, Crews FT (2012b) Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. J Neuroinflammation 9:130. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-130

Qin L, He J, Hanes RN, et al (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. J Neuroinflammation 5:10. https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-10

Quintana AR, Wang D, Forbes JE, Waxham MN (2005) Kinetics of calmodulin binding to calcineurin. Biochem Biophys Res Commun 334:674–680. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.152

Rabiant K, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O (2021) Sex difference in the vulnerability to hippocampus plasticity impairment after binge-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key? Addiction Biology 26:e13002. https://doi.org/10.1111/adb.13002

Rall JM, Mach SA, Dash PK (2003) Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. Brain Res 968:273–276. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02248-0

Ramachandran B, Ahmed S, Zafar N, Dean C (2015) Ethanol inhibits long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons, irrespective of lamina and stimulus strength, through neurosteroidogenesis. Hippocampus 25:106–118. https://doi.org/10.1002/hipo.22356

Ramón y Cajal S (1911) Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Maloine, Paris, France

Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. J Neurosci 16:5233–5255

Renteria R, Maier EY, Buske TR, Morrisett RA (2017) Selective alterations of NMDAR function and plasticity in D1 and D2 medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell following chronic intermittent ethanol exposure. Neuropharmacology 112:164–171. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.004

Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, et al (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. Neuropsychopharmacology 34:1721–1732. https://doi.org/10.1038/npp.2008.229

Risher M-L, Fleming RL, Boutros N, et al (2013) Long-Term Effects of Chronic Intermittent Ethanol Exposure in Adolescent and Adult Rats: Radial-Arm Maze Performance and Operant Food Reinforced Responding. PLoS One 8:e62940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062940

Roberson ED, Sweatt JD (1996) Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. J Biol Chem 271:30436–30441. https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30436

Roberto M, Nelson TE, Ur CL, Gruol DL (2002) Long-term potentiation in the rat hippocampus is reversibly depressed by chronic intermittent ethanol exposure. J Neurophysiol 87:2385–2397. https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2385

Rodenas-Ruano A, Chávez AE, Cossio MJ, et al (2012) REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. Nat Neurosci 15:1382–1390. https://doi.org/10.1038/nn.3214

Roh M-S, Cui FJ, Kim HK, Kang UG (2011) Regulation of NMDA receptor subunits after acute ethanol treatment in rat brain. Alcohol Alcohol 46:672–679. https://doi.org/10.1093/alcalc/agr124

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

Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, Verkhratsky A (2003) A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. J Neuroimmunol 144:61–67. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.08.030

Rubio-Araiz A, Porcu F, Pérez-Hernández M, et al (2017) Disruption of blood-brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model. Addict Biol 22:1103–1116. https://doi.org/10.1111/adb.12376

Ryabinin AE, Miller MN, Durrant S (2002) Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice. Pharmacol Biochem Behav 71:307–312. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00661-x

Sagarkar S, Balasubramanian N, Mishra S, et al (2019) Repeated mild traumatic brain injury causes persistent changes in histone deacetylase function in hippocampus: Implications in learning and memory deficits in rats. Brain Res 1711:183–192. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.022

Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, et al (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

Samuelsson A-M, Jennische E, Hansson H-A, Holmäng A (2006) Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290:R1345-1356. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2005

Sanchez-Alavez M, Nguyen W, Mori S, et al (2019) Time course of microglia activation and brain and blood cytokine/chemokine levels following chronic ethanol exposure and protracted withdrawal in rats. Alcohol 76:37–45. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.07.005

Santerre JL, Rogow JA, Kolitz EB, et al (2014) Ethanol dose-dependently elicits opposing regulatory effects on hippocampal AMPA receptor GluA2 subunits through a zeta inhibitory peptide-sensitive kinase in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. Neuroscience 280:50–59. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.003

Sauton P, Deschamps C, Jeanblanc V, et al (2021) Interstrain differences in voluntary binge-like drinking behavior and in two acute ethanol injections-induced synaptic plasticity deficits in rats. Addict Biol 26:e12992. https://doi.org/10.1111/adb.12992

Savonenko A, Munoz P, Melnikova T, et al (2009) Impaired cognition, sensorimotor gating, and hippocampal long-term depression in mice lacking the prostaglandin E2 EP2 receptor. Exp Neurol 217:63–73. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.01.016

Sawchuk SD, Reid HMO, Neale KJ, et al (2020) Effects of Ethanol on Synaptic Plasticity and NMDA Currents in the Juvenile Rat Dentate Gyrus. Brain Plast 6:123–136. https://doi.org/10.3233/BPL-200110

Schlesiger MI, Cressey JC, Boublil B, et al (2013) Hippocampal activation during the recall of remote spatial memories in radial maze tasks. Neurobiol Learn Mem 106:324–333. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.05.007

Schneider H, Pitossi F, Balschun D, et al (1998) A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 95:7778–7783. https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7778

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

Schummers J, Bentz S, Browning MD (1997) Ethanol's Inhibition of LTP May Not Be Mediated Solely via Direct Effects on the NMDA Receptor. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 21:404–408. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03783.x

Scoville WB, Milner B (1957) LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20:11–21

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. Prog Neurobiol 106–107:1–16. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001

Shahbazian MD, Grunstein M (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annu Rev Biochem 76:75–100. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114

Shaw KN, Commins S, O'Mara SM (2003) Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. Eur J Neurosci 17:2438–2446. https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02643.x

Sheela Rani CS, Ticku MK (2006) Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA(A) and NMDA receptor subunits. Alcohol 38:89–97. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.05.002

Sheikh BN (2014) Crafting the brain - role of histone acetyltransferases in neural development and disease. Cell Tissue Res 356:553–573. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1835-7

Shin R-M (2012) Cellular Mechanisms in the Amygdala Involved in Memory of Fear Conditioning. In: The Amygdala - A Discrete Multitasking Manager. IntechOpen

Shivakumar M, Subbanna S, Joshi V, Basavarajappa BS (2020) Postnatal Ethanol Exposure Activates HDAC-Mediated Histone Deacetylation, Impairs Synaptic Plasticity Gene Expression and Behavior in Mice. Int J Neuropsychopharmacol 23:324–338. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyaa017

Silvestre de Ferron B, Bennouar K-E, Kervern M, et al (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

Simms JA, Steensland P, Medina B, et al (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. Alcohol Clin Exp Res 32:1816–1823. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x

Simon-O'Brien E, Alaux-Cantin S, Warnault V, et al (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

Sinclair JG, Lo GF (1986) Ethanol blocks tetanic and calcium-induced long-term potentiation in the hippocampal slice. Gen Pharmacol 17:231–233. https://doi.org/10.1016/0306-3623(86)90144-8

Singh P, Thakur MK (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

Singh P, Thakur MK (2014) Reduced recognition memory is correlated with decrease in DNA methyltransferase1 and increase in histone deacetylase2 protein expression in old male mice. Biogerontology 15:339–346. https://doi.org/10.1007/s10522-014-9504-5

Sircar R (2017) Ethanol alters N-methyl-D-aspartate receptor regulation in the hippocampus of adolescent rats. Neuroreport 28:625–629. https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000787

Sircar R, Sircar D (2005) Adolescent rats exposed to repeated ethanol treatment show lingering behavioral impairments. Alcohol Clin Exp Res 29:1402–1410. https://doi.org/10.1097/01.alc.0000175012.77756.d9

Smith KW, Gierski F, Andre J, et al (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. https://doi.org/10.1111/adb.12332

Société Française d'Alcoologie (2015) Mésusage de l'alcool : dépistage, diagnostic et traitement. Recommandation de bonne pratique. Alcoologie et Addictologie 37:5–84

Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci 32:638–647. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002

Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 119:7–35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8

Soundararajan S, Narayanan G, Agrawal A, et al (2017) Relation between age at first alcohol drink & adult life drinking patterns in alcohol-dependent patients. Indian J Med Res 146:606–611. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1363_15

Spear LP (2018) Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. Nature Reviews Neuroscience 19:197–214. https://doi.org/10.1038/nrn.2018.10

Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99:195–231

Squire LR (2004) Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. Neurobiology of Learning and Memory 82:171–177. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005

Squire LR, Ojemann JG, Miezin FM, et al (1992) Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. Proc Natl Acad Sci U S A 89:1837–1841. https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1837

Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Mori F, et al (2019) Interleukin-6 Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Tissue Damage Compensation in Multiple Sclerosis. Neurorehabil Neural Repair 33:825–835. https://doi.org/10.1177/1545968319868713

Stanton P, Sarvey J (1984) Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. J Neurosci 4:3080–3088. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-12-03080.1984

Stanton PK, Winterer J, Bailey CP, et al (2003) Long-Term Depression of Presynaptic Release from the Readily Releasable Vesicle Pool Induced by NMDA Receptor-Dependent Retrograde Nitric Oxide. J Neurosci 23:5936–5944. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05936.2003

Staubli U, Lynch G (1990) Stable depression of potentiated synaptic responses in the hippocampus with 1-5 Hz stimulation. Brain Res 513:113–118. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91096-y

Staubli UV, Ji ZX (1996) The induction of homo- vs. heterosynaptic LTD in area CA1 of hippocampal slices from adult rats. Brain Res 714:169–176. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01523-x

Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, et al (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

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC (2005) Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. J Neurosci 25:3219–3228. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005

Stellwagen D, Malenka RC (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. Nature 440:1054–1059. https://doi.org/10.1038/nature04671

Stern CE, Corkin S, González RG, et al (1996) The hippocampal formation participates in novel picture encoding: evidence from functional magnetic resonance imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 93:8660–8665. https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8660

Stevens R, Cowey A (1973) Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. Brain Res 52:203–224. https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90659-8

Stragier E, Martin V, Davenas E, et al (2015) Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice. Transl Psychiatry 5:e696–e696. https://doi.org/10.1038/tp.2015.183

Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014) Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat Rev Neurosci 15:655–669. https://doi.org/10.1038/nrn3785

Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Abe K (1995) The Effects of Ethanol and Crocin on the Induction of Long-Term Potentiation in the CA1 Region of Rat Hippocampal Slices. JpnJPharmacol 67:395–397. https://doi.org/10.1254/jjp.67.395

Sun X, Zhao Y, Wolf ME (2005) Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. J Neurosci 25:7342–7351. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4603-04.2005

Swartzwelder HS, Park M-H, Acheson S (2017) Adolescent Ethanol Exposure Enhances NMDA Receptor-Mediated Currents in Hippocampal Neurons: Reversal by Gabapentin. Sci Rep 7:13133. https://doi.org/10.1038/s41598-017-12956-6

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

Swartzwelder NA, Risher ML, Abdelwahab SH, et al (2012) Effects of ethanol, Δ(9)-tetrahydrocannabinol, or their combination on object recognition memory and object preference in adolescent and adult male rats. Neurosci Lett 527:11–15. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.037

Tabrizian K, Hashemzaei M, Nasiri AA, et al (2018) Interactive involvement of hippocampal cAMP/PKA and cyclooxygenase-2 signaling pathways in spatial learning in the Morris water maze. Folia Neuropathol 56:58–66. https://doi.org/10.5114/fn.2018.74660

Takahashi Y, Yamashita R, Okano H, et al (2021) Aberrant neurogenesis and late onset suppression of synaptic plasticity as well as sustained neuroinflammation in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to ethanol in rats. Toxicology 462:152958. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152958

Tan M, Luo H, Lee S, et al (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. Cell 146:1016–1028. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008

Tancredi V, D'Antuono M, Cafè C, et al (2000) The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. J Neurochem 75:634–643. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750634.x

Tancredi V, D'Arcangelo G, Grassi F, et al (1992) Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. Neurosci Lett 146:176–178. https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90071-e

Tang S-C, Arumugam TV, Xu X, et al (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc Natl Acad Sci U S A 104:13798–13803. https://doi.org/10.1073/pnas.0702553104

Tang X-H, Zhang G-F, Xu N, et al (2020) Extrasynaptic CaMKIIα is involved in the antidepressant effects of ketamine by downregulating GluN2B receptors in an LPS-induced depression model. J Neuroinflammation 17:181. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01843-z

Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. Mol Neurobiol 53:1181–1194. https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5

Tapia-Rojas C, Carvajal FJ, Mira RG, et al (2018) Adolescent Binge Alcohol Exposure Affects the Brain Function Through Mitochondrial Impairment. Mol Neurobiol 55:4473–4491. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0613-4

Teather LA, Packard MG, Bazan NG (2002) Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. Learn Mem 9:41–47. https://doi.org/10.1101/lm.43602

Terrando N, Eriksson LI, Ryu JK, et al (2011) Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. Ann Neurol 70:986–995. https://doi.org/10.1002/ana.22664

Teyler TJ, DiScenna P (1984) The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. Brain Res Bull 12:711–719. https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90152-7

Thinschmidt JS, Walker DW, King MA (2003) Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. Synapse 48:189–197. https://doi.org/10.1002/syn.10203

Tian F, Hu X-Z, Wu X, et al (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

Tokuda K, Izumi Y, Zorumski CF (2011) Ethanol enhances neurosteroidogenesis in hippocampal pyramidal neurons by paradoxical NMDA receptor activation. J Neurosci 31:9905–9909. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1660-11.2011

Tokuda K, Zorumski CF, Izumi Y (2007) Modulation of hippocampal long-term potentiation by slow increases in ethanol concentration. Neuroscience 146:340–349. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.037

Topuz RD, Gunduz O, Tastekin E, Karadag CH (2020) Effects of hippocampal histone acetylation and HDAC inhibition on spatial learning and memory in the Morris water maze in rats. Fundam Clin Pharmacol 34:222–228. https://doi.org/10.1111/fcp.12512

Tournier N, Pottier G, Caillé F, et al (2021) Nalmefene alleviates the neuroimmune response to repeated binge-like ethanol exposure: A TSPO PET imaging study in adolescent rats. Addict Biol 26:e12962. https://doi.org/10.1111/adb.12962

Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA Receptors at Hippocampal Synapses. Neuron 34:255–264. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00658-X

Townshend JM, Duka T (2002) Patterns of alcohol drinking in a population of young social drinkers: a comparison of questionnaire and diary measures. Alcohol Alcohol 37:187–192

Townshend JM, Duka T (2005) Binge drinking, cognitive performance and mood in a population of young social drinkers. Alcohol Clin Exp Res 29:317–325. https://doi.org/10.1097/01.alc.0000156453.05028.f5

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacol Rev 62:405–496. https://doi.org/10.1124/pr.109.002451

Tremwel MF, Hunter BE (1994) Effects of chronic ethanol ingestion on long-term potentiation remain even after a prolonged recovery from ethanol exposure. Synapse 17:141–148. https://doi.org/10.1002/syn.890170210

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor–Dependent Synaptic Plasticity in Spatial Memory. Cell 87:1327–1338. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81827-9

Tulving E (1972) Organisation of Memory. 381–403

Umhau JC, Schwandt M, Solomon MG, et al (2014) Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholics: support for a neuroinflammatory model of chronic alcoholism. Alcohol Clin Exp Res 38:1301–1306. https://doi.org/10.1111/acer.12367

Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. Brain Pathol 14:365–371. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00079.x

Van Hees L, Didone V, Charlet-Briart M, et al (2022) Voluntary alcohol binge-drinking in adolescent C57Bl6 mice induces delayed appearance of behavioural defects in both males and females. Addiction Biology 27:e13102. https://doi.org/10.1111/adb.13102

Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, et al (2007) Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. J Neurosci 27:6128–6140. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007

Vetreno RP, Crews FT (2012) Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. Neuroscience 226:475–488. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.046

Vetreno RP, Crews FT (2015) Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. Front Neurosci 9:35. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00035

Vetreno RP, Lawrimore CJ, Rowsey PJ, Crews FT (2018) Persistent Adult Neuroimmune Activation and Loss of Hippocampal Neurogenesis Following Adolescent Ethanol Exposure: Blockade by Exercise and the Anti-inflammatory Drug Indomethacin. Front Neurosci 12:200. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00200

Vetreno RP, Qin L, Crews FT (2013) Increased receptor for advanced glycation end product expression in the human alcoholic prefrontal cortex is linked to adolescent drinking. Neurobiol Dis 59:52–62. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.002

Vicini S, Wang JF, Li JH, et al (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. J Neurophysiol 79:555–566. https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.2.555

Vinader-Caerols C, Talk A, Montañés A, et al (2017) Differential Effects of Alcohol on Memory Performance in Adolescent Men and Women with a Binge Drinking History. Alcohol Alcohol 52:610–616. https://doi.org/10.1093/alcalc/agx040

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, et al (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. J Neurosci 23:8692–8700

Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. Nat Rev Neurosci 6:626–640. https://doi.org/10.1038/nrn1722

Waddington CH (2012) The Epigenotype. Int J Epidemiol 41:10–13. https://doi.org/10.1093/ije/dyr184

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

Wagner JL, Zhou FC, Goodlett CR (2014) Effects of one- and three-day binge alcohol exposure in neonatal C57BL/6 mice on spatial learning and memory in adolescence and adulthood. Alcohol 48:99–111. https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.12.001

Walter TJ, Crews FT (2017) Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. J Neuroinflammation 14:86. https://doi.org/10.1186/s12974-017-0856-z

Wang D, Cui Z, Zeng Q, et al (2009) Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. PLoS One 4:e7486. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007486

Wang J, Lanfranco MF, Gibb SL, et al (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 30:10187–10198. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2268-10.2010

Wang L-X, Zhang S-X, Wu H-J, et al (2019) M2b macrophage polarization and its roles in diseases. J Leukoc Biol 106:345–358. https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR

Wang N, Mi X, Gao B, et al (2015) Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. Neuroscience 287:144–156. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.021

Ward RJ, Colivicchi MA, Allen R, et al (2009) Neuro-inflammation induced in the hippocampus of "binge drinking" rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. J Neurochem 111:1119–1128. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06389.x

Warden AS, Wolfe SA, Khom S, et al (2020) Microglia control escalation of drinking in alcohol dependent mice: Genomic and synaptic drivers. Biol Psychiatry 88:910–921. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.05.011

Wechsler H, Lee JE, Kuo M, Lee H (2000) College binge drinking in the 1990s: a continuing problem. Results of the Harvard School of Public Health 1999 College Alcohol Study. J Am Coll Health 48:199–210. https://doi.org/10.1080/07448480009599305

Weiner JL, Zhang L, Carlen PL (1994) Potentiation of GABAA-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. J Pharmacol Exp Ther 268:1388–1395

Weitemier AZ, Ryabinin AE (2003) Alcohol-induced memory impairment in trace fear conditioning: a hippocampus-specific effect. Hippocampus 13:305–315. https://doi.org/10.1002/hipo.10063

West RK, Maynard ME, Leasure JL (2018) Binge Ethanol Effects on Prefrontal Cortex Neurons, Spatial Working Memory and Task-Induced Neuronal Activation in Male and Female Rats. Physiol Behav 188:79–85. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.01.027

White AM (2003) What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. Alcohol Res Health 27:186–196

White G, Lovinger DM, Weight FF (1990) Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not alter GABA-activated current in an isolated adult mammalian neuron. Brain Research 507:332–336. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90292-J

Wigström H, Gustafsson B (1983) Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. Nature 301:603–604. https://doi.org/10.1038/301603a0

Wills TA, Baucum AJ, Louderback KM, et al (2017) Chronic Intermittent Alcohol Disrupts the GluN2B-Associated Proteome and Specifically Regulates Group I mGlu Receptor Dependent Long-Term Depression. Addict Biol 22:275–290. https://doi.org/10.1111/adb.12319

Wilson AJ, Byun D-S, Popova N, et al (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. J Biol Chem 281:13548–13558. https://doi.org/10.1074/jbc.M510023200

Wisden W, Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. Curr Opin Neurobiol 3:291–298. https://doi.org/10.1016/0959-4388(93)90120-n

Wong L-W, Chong YS, Wong WLE, Sajikumar S (2020) Inhibition of Histone Deacetylase Reinstates Hippocampus-Dependent Long-Term Synaptic Plasticity and Associative Memory in Sleep-Deprived Mice. Cereb Cortex 30:4169–4182. https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa041

Wood AM, Kaptoge S, Butterworth AS, et al (2018) Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies. Lancet 391:1513–1523. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30134-X

Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, et al (2004) Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. Neurobiol Dis 17:403–414. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.08.006

Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, et al (2003) Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. Brain Res 963:252–261. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04036-2

Wu C, Sun D (2015) GABA receptors in brain development, function, and injury. Metab Brain Dis 30:367–379. https://doi.org/10.1007/s11011-014-9560-1

Yang H, Zhang J, Breyer RM, Chen C (2009) Altered hippocampal long-term synaptic plasticity in mice deficient in the PGE2 EP2 receptor. J Neurochem 108:295–304. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05766.x

Yang Q-Q, Zhou J-W (2019) Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. Glia 67:1017–1035. https://doi.org/10.1002/glia.23571

Yang S, Liu Z-W, Wen L, et al (2005) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. Brain Res 1034:172–179. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.018

Yao B, Christian KM, He C, et al (2016) Epigenetic mechanisms in neurogenesis. Nat Rev Neurosci 17:537–549. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.70

Yirmiya R, Winocur G, Goshen I (2002) Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. Neurobiol Learn Mem 78:379–389. https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4072

You C, Zhang H, Sakharkar AJ, et al (2014) Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. Int J Neuropsychopharmacol 17:313–322. https://doi.org/10.1017/S1461145713001144

Young C, Luo MZ, Shen YZ, Gean PW (2001) Dissociation between synaptic depression and block of long-term depression induced by raising the temperature in rat hippocampal slices. Synapse 40:27–34. https://doi.org/10.1002/1098-2396(200104)40:1<27::AID-SYN1023>3.0.CO;2-3

Yuen WS, Chan G, Bruno R, et al (2020) Adolescent Alcohol Use Trajectories: Risk Factors and Adult Outcomes. Pediatrics 146:e20200440. https://doi.org/10.1542/peds.2020-0440

Zahr NM, Luong R, Sullivan EV, Pfefferbaum A (2010) Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-day alcohol binge protocol. Alcohol Clin Exp Res 34:1858–1870. https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01274.x

Zamroziewicz M, Raskin SA, Tennen H, et al (2017) Effects of drinking patterns on prospective memory performance in college students. Neuropsychology 31:191–199. https://doi.org/10.1037/neu0000313

Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, et al (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. Cell 107:617–629. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00585-2

Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al (2005) Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. Breast Cancer Res Treat 94:11–16. https://doi.org/10.1007/s10549-005-6001-1

Zhao J, Bi W, Xiao S, et al (2019) Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. Sci Rep 9:5790. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8

Zhao Y-N, Wang F, Fan Y-X, et al (2013) Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. Behav Brain Res 236:270–282. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.052

Zhou Z, Liu A, Xia S, et al (2018) The C-terminal tails of endogenous GluA1 and GluA2 differentially contribute to hippocampal synaptic plasticity and learning. Nat Neurosci 21:50–62. https://doi.org/10.1038/s41593-017-0030-z

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. J Neurosci 6:2950–2967

Zou J, Crews F (2006) CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. Cell Mol Neurobiol 26:385–405. https://doi.org/10.1007/s10571-006-9045-9

Bibliographie non issue d'articles

Ministère des Solidarités et de la Santé, *Stratégie nationale de santé 2018-2022*. 2017

NIAAA :https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking

OFDT, *Alcool : évolution des quantités consommées par habitant âgé de 15 ans et plus depuis 1961*

OFDT, *Les évolutions récentes de la consommation d'alcool en France et de ses conséquences*, 2020

OFDT Tendances n° 132, juin 2019 : résultats de l'enquête EnCLASS

Santé Publique France, *Quels sont les risques de la consommation d'alcool pour la santé ?* 2019

RESUME

Le comportement de *binge drinking (BD)*, défini comme la répétition d'épisodes de consommation rapide et massive d'alcool (éthanol), est très répandu chez les adolescents et jeunes adultes et peut conduire à des déficits de mémoire à long terme. Cependant, les mécanismes neurobiologiques de l'éthanol lors des premiers épisodes de BD, qui pourraient révéler les éléments de base de la réponse à l'alcool, restent méconnus. Dans un premier travail, notre laboratoire avait mis en évidence que deux épisodes de BD chez le rat adolescent (EtOH 3g/kg i.p.; éthanolémie≈2g/L) suffisaient à induire des déficits d'apprentissage après 48h, associés sur le plan cellulaire à une abolition de la dépression à long terme et à une augmentation de la potentialisation à long terme – deux types de plasticité qui correspondent aux mécanismes cellulaires de la mémoire – enregistrées *ex vivo* dans l'aire CA1 de l'hippocampe, et à une augmentation de la fonctionnalité des sous-unités GluN2B du récepteur au glutamate de type NMDA. Tout l'enjeu de ce travail de thèse a été de déterminer comment ces effets apparaissaient, en envisageant l'implication de mécanismes épigénétiques et/ou neuroinflammatoires. En combinant des approches comportementales, électrophysiologiques sur tranches d'hippocampe, pharmacologiques et biochimiques, nous démontrons que 48h après l'éthanol, l'expression de l'histone déacétylase de type 2 (HDAC2) est augmentée dans l'aire CA1 et que l'administration préalable de butyrate de sodium (un inhibiteur des HDAC) prévient l'ensemble des effets de l'éthanol. De plus, nos résultats indiquent une sous-expression neuronale du récepteur TLR4 dans CA1 48h après les deux épisodes de BD et l'administration de substances anti-inflammatoires telles que la minocycline, l'indométhacine ou l'antagoniste du TLR4, le TAK-242, préviennent également les perturbations induites par l'éthanol. Nous concluons ainsi que dès les premières expositions, le BD déclenche des processus neuroinflammatoires qui semblent intervenir précocement, mais également des processus épigénétiques qui interviennent peut-être plus tardivement et qui perturbent la plasticité synaptique dans l'hippocampe et par conséquent, l'apprentissage. Bloquer la mise en place de tels processus ouvre des perspectives intéressantes dans la prévention des déficits mnésiques chez les *binge drinkers.*

Mots clés : *Binge drinking*, apprentissage, plasticité synaptique, épigénétique, neuroinflammation, GluN2B

ABSTRACT

Binge drinking (BD) behaviour, defined as repeated episodes of rapid and massive alcohol (ethanol) consumption, is widespread among adolescents and young adults and can lead to long term memory deficits. Nevertheless, the neurobiological mechanisms of ethanol during the initial BD episodes, which may reveal the elementary steps of the response to ethanol, remain unknown. In a first work, our laboratory revealed that two ethanol BD episodes in adolescent rats (EtOH 3g/kg, i.p.; blood ethanol content 2g/L) where sufficient to induce learning deficits after 48h, associated, at the cellular level, with an abolition of long term depression and an increase in long term potentiation - two types of synaptic plasticity that corresponds to the cellular mechanisms of memory - recorded ex vivo in the CA1 area of the hippocampus, and with an increase in the functionality of the GluN2B subunit of the NMDA-type glutamate receptor. The challenge of this thesis was to determine how these effects appeared, by considering the involvement of epigenetic and/or neuroinflammatory mechanisms. By combining behavioral, electrophysiological on hippocampal slices, pharmacological et biochemical approaches, we demonstrate that 48h after ethanol, the expression of type 2 histone deacetylase (HDAC2) is increased in the CA1 area and that the prior administration of sodium butyrate (an HDAC inhibitor) prevents the overall effects of ethanol. Furthermore, our results show a decrease of neuronal TLR4 expression in CA1 48h after the two BD episodes and the administration of anti-inflammatory drugs such as minocycline, indomethacin of the TLR4 antagonist TAK-242 also prevents ethanol induced disturbances. We thus conclude that from the first exposures, BD triggers neuroinflammatory processes that seem to occur early, but also epigenetic processes that may occur later and disrupt synaptic plasticity in the hippocampus and consequently, learning.Blocking the establishment of such processes opens interesting perspectives in the prevention of memory deficits in binge drinkers.

Key words : Binge drinking, learning, synaptic plasticity, epigenetic, neuroinflammation, GluN2B