

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

ÉQUIPE U930

Troubles affectifs : des neurosciences fondamentales à la clinique

THÈSE présentée par :

Gaëlle DOMINGUEZ

soutenue le : **17 décembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de
Tours**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Impact d'un sevrage à l'alcool sur l'activité
du réseau hippocampo-préfrontal au cours
d'une épreuve de mémoire de travail:
comparaison avec le stress chronique léger
imprédictible**

THÈSE dirigée par :

BERACOCHEA Daniel
BELZUNG Catherine

DR CNRS, Univ. de Bordeaux
PR-U INSERM, Univ. François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

JAY Thérèse
GISQUET-VERRIER Pascale

DR INSERM, Univ. Paris Descartes
DR CNRS, Université Paris-Sud

JURY:

EL HAGE Wissam
MOISAN Marie-pierre

PH-AH INSERM, Univ. François-Rabelais, Tours
DR INRA, Univ. Bordeaux

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes directeurs de thèse Daniel Béracochéa et Catherine Belzung pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et pour la confiance placée en moi au cours de ces trois années. Vous m'avez permis de travailler en autonomie, de former et superviser plusieurs étudiants, tout en me guidant et en m'encourageant. Vos conseils scientifiques et votre soutien matériel m'ont également permis de développer de nombreuses compétences techniques et de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions. Vos conseils pour la rédaction des articles et de la thèse ont également été précieux. Merci à tout les deux, pour votre gentillesse et votre soutien, vous m'avez permis de réaliser une thèse enrichissante, sur le plan humain et scientifique.

Je souhaite également remercier sincèrement les membres de mon jury qui ont acceptés d'évaluer ce travail : Thérèse Jay et Pascale Gisquet-Verrier en qualité de rapporteurs, Marie-Pierre Moisan et Wissam El-Hage en qualité d'examineur, et ce dernier en qualité de président du jury. Merci pour l'intérêt porté à ce travail, pour le temps consacré à la lecture et à la critique de ce manuscrit.

A Monsieur le Docteur Jean-René Cazalets, Directeur de l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INICIA) pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier Mr Christophe Piérard qui a consacré plusieurs jours à me former à la très délicate et exigeante technique de microdialyse intracérébrale. La maîtrise de cette technique a été un vrai « plus » pour ma thèse et m'a permis de développer des aptitudes telles que la patience et la persévérance.

Un grand merci à toute l'équipe de l'INICIA de Bordeaux, Nicole Mons, Vincent David, Jean-Louis Guillou, Jacques Micheau, et Marc Corio pour ces trois années passées avec vous et pour vos conseils pendant nos réunions hebdomadaires. Je tiens à remercier, tout particulièrement, Nicole Mons, qui a été responsable de mes stages de Master 1 et 2 et qui m'a également soutenu pendant ma thèse, par sa présence, ses idées et ses conseils d'écriture. Merci également aux thésards de l'équipe, Matthias Vandesquille, Mathieu Baudonnat, Malorie Dagnas, Rodolphe Dorey, Thomas Prevost et Pierre Faucher pour nos échanges scientifiques (ou non scientifiques). Je remercie tout particulièrement Matthias, Mathieu et Malorie pour le temps qu'ils ont consacré à ma formation à mon arrivée et pour les soirées à la Parcelle. Merci également à Nadia Henkous, Eva Tello-pinas, Laurence Decorte et Ali

Krazem pour leurs aides et leurs conseils. Je remercie tout particulièrement Couscous avec qui j'ai partagé mon bureau pendant 45 mois, toujours avec le sourire ; merci de ta bonne humeur constante. Je la remercie également pour son aide, ses conseils techniques et le temps qu'elle m'a consacré. Je remercie également Marie et Magalie également présentes dans le bureau durant ma dernière année de thèse avec qui j'ai partagé de bons moments. Merci, également à Dominique Panzeri et Nathalie Argenta qui ont pris soin de mes nombreuses petites souris pendant 3 ans. Enfin, j'ai également une pensée pour les stagiaires présentes durant ma troisième année de thèse, Jennifer et Ambre, qui m'ont apporté leurs aides pour mes dernières expériences.

Je tiens également à remercier l'Unité de l'INSERM Imagerie et Cerveau de Tours pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et leurs recommandations à chacune de mes visites à Tours.

Merci également aux personnes avec qui j'ai collaboré et qui m'ont permis de participer à la réalisation de plusieurs articles: Marie-Pierre Moisan, Katia Touyarot et Christophe Piérard.

Je remercie l'Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB) pour son soutien financier.

Je remercie également mes proches et amis pour leurs soutiens et leurs présences au cours de ces trois années.

Résumé

Notre étude a pour but de déterminer l'implication des glucocorticoïdes (GCs) centraux sur l'activité du réseau hippocampe-préfrontal (HPC-CPF) ainsi que leurs rôles dans l'émergence et le maintien d'altérations de la mémoire de travail (MDT) durant l'alcoolisation chronique (12% durant 6 mois), après un sevrage aigu (1 semaine) ou prolongé (6 semaines). De plus, nous avons comparé les effets du sevrage à ceux résultant d'un stress chronique léger imprédictible (SCLI) modélisant la dépression.

Nos données montrent que le sevrage (aigu et prolongé) ainsi que le SCLI, mais non l'alcoolisation, induisent des troubles de MDT accompagnés de déficits d'activation neuronale mesurés par le niveau de CREB phosphorylé (pCREB) dans le CPF et l'HPC. Le sevrage (aigu et prolongé) induit également une augmentation excessive des taux de corticostérone dans le CPF, mais non dans l'HPC, durant la tâche de MDT alors que l'augmentation excessive de corticostérone est observée dans les deux structures cérébrales chez des animaux SCLI.

Sur un plan pharmacologique, l'inhibition de la synthèse des GCs permet de restaurer la MDT et l'activité pCREB des souris sevrées et SCLI. De plus, chez les souris sevrées, l'augmentation de pCREB ou le blocage des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) dans le CPF, mais non dans l'HPC, restaure la MDT. Ces résultats démontrent l'implication spécifique de l'altération du CPF induite par les GCs dans l'émergence et le maintien des troubles cognitifs chez la souris sevrée. En outre, l'efficacité du diazépam (1mg/kg durant 9 jours consécutifs), utilisé dans le traitement du sevrage à l'alcool chez l'homme a été testée sur ces troubles chez la souris sevrée. Si un effet bénéfique est bien observé à court terme tant sur l'anxiété, la MDT, les paramètres endocriniens et neuronaux, cet effet est atténué après 6 semaines de sevrage. Ce résultat suggère que le sevrage prolongé atténue l'effet du diazépam ce qui pourrait faciliter la réémergence de l'addiction à l'alcool chez l'homme.

En conclusion, à l'inverse du SCLI, le sevrage alcoolique induit une altération plus spécifique des fonctions du CPF suggérant une nouvelle stratégie thérapeutique potentielle compte tenu des implications sélectives du CPF et des MR dans la réversibilité des troubles induits par le sevrage.

Mot clés : Sevrage à l'alcool, Corticostérone, Cortex préfrontal, Hippocampe, Mémoire de travail, CREB, Anxiété

Résumé en anglais

Our study was aimed to determine the involvement of central glucocorticoids (GCs) on the emergence and maintenance of working memory (WM) alterations during chronic alcohol consumption (12% for 6 months, Alcohol) and after an acute (1 week, *1W*) or prolonged (6 weeks, *6W*) withdrawal periods. Moreover, the cognitive, emotional and neurobiological impacts of alcohol-withdrawal were compared to those resulting from an unpredictable mild chronic stress (UCMS), modeling depression. Our data show that alcohol-withdrawal and UCMS but not Alcohol, induce WM disorders associated to deficits of neuronal activation measured by phosphorylated CREB (pCREB) level both in the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HPC). Both 1 week and 6 weeks withdrawal periods also induced excessive and long-lasting increases in corticosterone concentrations only in the PFC but not in the HPC during WM testing; in contrast, an excessive corticosterone increase was observed in both brain structures in UCMS animals.

Furthermore, we showed that the inhibition of GCs synthesis by systemic injection of metyrapone can restore WM and normalized pCREB in both withdrawn and UCMS mice. In addition, in withdrawn mice, the increase of pCREB by rolipram or the blockade of the mineralocorticoid receptor (MR) by the antagonist spironolactone injected *in situ* into the PFC, but not into the HPC, restored WM performance and pCREB activity in withdrawn animals. These overall results demonstrate the specific involvement of PFC alterations induced by GCs in the emergence and maintenance of cognitive disorders in withdrawn mice.

Finally, we tested the impact of chronic administration (1 mg/kg for 9 consecutive days) of the benzodiazepine diazepam, a compound used during alcohol withdrawal treatment in humans, on cognitive and neural activity disorders induced by alcohol-withdrawal. A transitory beneficial effect was observed 1 week after the cessation of the treatment on anxiety, WM, neural and endocrinal parameters, but these effects were significantly attenuated after 6 weeks of withdrawal.

In conclusion, unlike UCMS, alcohol withdrawal induced specific alterations of PFC functions due to GCs dysfunction; this result suggests potential alternative therapeutic strategies (other than benzodiazepines) to reverse the long-lasting cognitive disorders induced by alcohol-withdrawal.

Keywords: Alcohol, withdrawal, Corticosterone, Prefrontal cortex, Hippocampus, working memory, CREB, Anxiety.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	4
Résumé en anglais	5
Table des matières	6
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Liste des annexes.....	15
Liste des abréviations	16
Introduction	18
Première partie : Les émotions.....	21
A. Théories des émotions	22
1. Généralités.....	22
2. Fonctions des émotions	22
B. Le stress	25
1. Le concept de stress.....	25
2. Physiologie de l'axe corticotrope	27
a. Organisation fonctionnelle	27
b. Rétrocontrôle négatif.....	29
c. Cycle nycthémeral	29
3. Les glucocorticoïdes.....	30
a. Biosynthèse des glucocorticoïdes.....	30
b. Circulation et métabolisme des glucocorticoïdes.....	32
c. Récepteurs aux glucocorticoïdes	33
d. Actions des glucocorticoïdes.....	37
4. Dysfonctionnement de l'axe corticotrope : la dépression	38
Deuxième partie : La mémoire.....	43
A. Théories de la mémoire	44
1. Généralités.....	44
2. Mise en évidence des systèmes de mémoire ; le cas du patient H.M.....	44
B. Les systèmes de mémoire	46
1. Modèle modal d'Atkinson et Shiffrin	46
2. Modèle de la mémoire à long terme.....	47

a. Modèle dichotomique de Squire.....	47
b. Modèle de Tulving	48
C. La mémoire de travail.....	50
1. Les modèles.....	50
a. Modèle de Baddeley	50
b. Modèle de Cowan.....	52
2. Aspect neurofonctionnel	52
a. Le cortex préfrontal	52
b. L'hippocampe.....	56
c. Interactions entre le cortex préfrontal et l'hippocampe.....	58
d. Mécanismes moléculaires	59
Troisième partie : Alcoolisme et sevrage.....	61
A. Alcoolisme.....	62
1. Lésions cérébrales et troubles cognitifs	62
2. Principales comorbidités psychiatriques	64
3. Action neurochimique de l'alcool	65
a. Protéines	65
b. Neurotransmetteurs	67
c. Perturbations de l'axe corticotrope.....	68
B. Sevrage à l'alcool	70
1. Atteintes neurobiologiques lors du sevrage	70
a. Lésions cérébrales	70
b. Altération de la mémoire lors du sevrage.....	71
2. Principales comorbidités psychiatriques	72
3. Perturbations neurochimiques durant le sevrage.....	72
a. Protéines	72
b. Neurotransmetteurs	74
c. Perturbations de l'axe corticotrope.....	74
Quatrième partie Relations entre émotion et mémoire et objectifs de l'étude.....	76
A. Processus cognitifs affectés par le stress	77
B. Objectifs de l'étude.....	79
C. Principaux résultats obtenus	81
Matériels et Méthodes	84
A. Animaux et procédures comportementales	85

1. Animaux	85
a. La lignée	85
b. Conditions d'élevage	85
2. Modèles expérimentaux	85
a. Procédure d'alcoolisation chronique	85
b. Procédure de stress chronique léger imprédictible	86
3. Modèles comportementaux	88
a. L'alternance spontanée	88
b. Le labyrinthe en croix surélevé	90
c. Test d'exploration d'une planche à 9 trous	91
4. Chirurgie stéréotaxique	92
a. Procédure générale	92
b. Injections intracérébrales	93
c. Contrôles histologiques	93
B. Approches moléculaires	94
1. Immunohistochimie	94
a. Procédure générale	94
b. Quantification	95
a. Choix de l'activateur	96
C. Etude neurobiologique de l'axe corticotrope	98
1. Dosage de la corticostérone	98
a. Prélèvements sanguins	98
b. Microdialyse	98
c. Dosage ELISA	100
2. Modulations pharmacologiques de l'axe corticotrope	100
a. Corticostérone	100
b. Metyrapone	101
c. Mifépristone et Spironolactone	101
d. Diazépam	101
D. Analyses statistiques	103
Partie Expérimentale	104
Chapitre I : L'amélioration de l'activité pCREB dans le cortex préfrontal restaure la mémoire de travail altérée par un sevrage à l'alcool	105
A. Introduction	106

B. Méthodologie.....	107
C. Résultats.....	109
Expérience 1. Le sevrage et le SCLI induisent une altération de la MDT associée à une réduction de pCREB et d'Ac-H4 dans le CPF.	109
Expérience 2. Le rolipram atténue les déficits de MDT et rétablit les niveaux de pCREB des souris <i>Sevré</i> et <i>SCLI</i>	114
Expérience 3. L'injection in situ de Sp-cAMPS dans le CPF, mais non dans l'HPC dorsal, atténue les déficits de MDT induits par le sevrage.	116
D. Discussion	119
Chapitre II : Le sevrage à l'alcool induit une augmentation anormale des taux de corticostérone dans le cortex préfrontal spécifiquement.....	122
A. Introduction	123
B. Méthodologie.....	125
C. Résultats.....	127
Expérience 1. Le sevrage et le SCLI induisent une augmentation de l'anxiété une semaine après la procédure de stress.....	127
Expérience 2. Elévation de la concentration de corticostérone dans le CPF chez les souris <i>Sevré</i> et <i>SCLI</i>	130
D. Discussion	135
Chapitre III : Le sevrage à l'alcool perturbe la mémoire de travail via l'action délétère de la corticostérone sur pCREB.....	138
A. Introduction	139
B. Méthodologie.....	140
C. Résultats.....	142
Expérience 1. Le rolipram diminue l'anxiété des groupes <i>Sevré IS</i> et <i>SCLI</i>	142
Expérience 2. L'augmentation pharmacologique de la corticostérone chez le groupe <i>Contrôle</i> perturbe la MDT et réduit pCREB.....	143
Expérience 3. L'inhibition de la synthèse de corticostérone chez les groupes <i>Sevré</i> et <i>SCLI</i> atténue les déficits de MDT et de pCREB	145
Expérience 4. Le blocage des récepteurs MR dans le CPF supprime les déficits de MDT induit par le sevrage.	147
D. Discussion	149
Chapitre IV : Efficacité du diazépam pour prévenir les perturbations du cortex préfrontal induites par le sevrage à l'alcool	151

A. Introduction	152
B. Méthodologie.....	154
C. Résultats.....	156
Expérience 1. Le traitement chronique au diazépam induit une diminution de l’anxiété..	156
Expérience 2. Le diazépam améliore transitoirement les performances de MDT et pCREB dans le CPF chez le groupe Sevré 1S	157
Expérience 3. Le diazépam réduit l’augmentation excessive du taux de corticostérone dans le CPF induite par le sevrage.....	161
D. Discussion	164
Discussion générale et perspectives	167
1. Modèle de sevrage à l’alcool.....	168
2. Modèle de la dépression : le stress chronique imprédictible.....	169
3. Modèle d’étude de la mémoire de travail.....	170
4. Activation cérébrale lors de l’AS	171
5. Perturbations des profils d’activations moléculaires et neuroendocriniens induits par le sevrage.....	172
6. Perturbations des profils d’activations moléculaires et neuroendocriniens induits par le SCLI	176
7. Comparaison des altérations induites par le sevrage et le SCLI	178
8. Hypothèses du mécanisme d’action des GCs sur pCREB	179
9. Traitement thérapeutique.....	182
10. Critique de l’étude	183
Conclusion.....	184
Bibliographie.....	186
Annexes.....	215
Résumé.....	273
Résumé en anglais.....	273

Liste des tableaux

Tableau 1 : homologues régionales du CPF entre primate et rongeur	53
Tableau 2 : protocole de stress chronique léger imprédictible sur 6 semaines.....	87
Tableau 3 : débit et volume injecté dans le cortex préfrontal et l'hippocampe dorsal au cours d'une procédure d'injection in situ.	93
Tableau 4 : effectif des groupes expérimentaux en conditions naïve ou test	155

Liste des figures

Figure 1 : illustration des lésions cérébrales de Phineas Gage dans le cortex préfrontal.	23
Figure 2 : structures impliquées dans le système limbique.	24
Figure 3 : modèle biphasique et réciproque de réallocation des ressources neuronales en réponse à un stress, selon Hermans (2014).	27
Figure 4 : organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope, d'après Lupien et al 2009	28
Figure 5 : sécrétion circadienne du cortisol et de l'ACTH (Windle et al., 1998a, Henley et al., 2009).	30
Figure 6 : sécrétion ultradienne de la corticostérone.	30
Figure 7 : biosynthèse de la corticostérone.	31
Figure 8 : principaux domaines composant les récepteurs MR et GR (Beato et Klug, 2000).	35
Figure 9 : mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes.	36
Figure 10 : illustration de la résection du lobe temporo-médian effectuée par Scoville sur le patient H.M.	45
Figure 11 : illustration du modèle modal de la mémoire d'après Atkinson et Shiffrin (1968).	46
Figure 12 : schéma d'après la classification dichotomique, proposée par Squire (2004).	47
Figure 13 : modèle théorique SPI, de l'organisation des systèmes de mémoire, selon Tulving (1995).	49
Figure 14 : modèle de la mémoire de travail, selon Baddeley (2000).	52
Figure 15 : organisation du cortex préfrontal chez le rongeur.	53
Figure 16 : principales projections des cortex infralimbique (A) et prélimbique (B).	55
Figure 17 : structure de la formation hippocampique.	57
Figure 18 : illustration des effets de l'alcool sur le cerveau du sujet alcoolique et Korsakoff par rapport à un sujet contrôle.	63
Figure 19 : modèle hypothétique de l'action de l'alcool dans l'amygdale sur les protéines kinases et CREB impliqués dans la régulation de l'anxiété.	66
Figure 20 : modèle hypothétique de l'action de l'alcool dans l'amygdale sur les protéines kinases et CREB impliquées dans la régulation de l'anxiété durant la prise aiguë d'alcool, la consommation chronique et le sevrage, d'après monnat (2009).	73
Figure 21 : labyrinthe en T.	89
Figure 22 : labyrinthe en croix surélevé.	91
Figure 23 : illustrations des zones cérébrales quantifiées.	96
Figure 24 : structure moléculaire du rolipram.	97
Figure 25 : Dispositif de microdialyse adapté pour la réalisation du test d'AS dans le labyrinthe en T.	99
Figure 26 : structure moléculaire de la corticostérone	100
Figure 27 : structure moléculaire de la métyrapone	101
Figure 28 : structures moléculaires de la mifepristone (A) et de la spironolactone (B).	101

Figure 29 : schéma du traitement au diazépam sur 9 jours consécutifs.	102
Figure 30 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur les performances d'AS.	110
Figure 31 : étude de l'immunoréactivité pCREB en conditions naïve et test.	111
Figure 32 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'acétylation de H3 et H4 en condition naïve.	112
Figure 33 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'acétylation de H3 et H4 en condition test.	113
Figure 34: effets du rolipram sur les performances d'AS.	115
Figure 35: effets du rolipram sur la phosphorylation de CREB après un test de MDT.	116
Figure 36 : effets de l'injection in situ de Sp-cAMPS dans le CPF ou l'HPC dorsal sur la MDT.	117
Figure 37 : composition des groupes expérimentaux et déroulement de l'expérience 1.	125
Figure 38 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le poids.	127
Figure 39 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'état du pelage pendant 6 semaines d'observation.	128
Figure 40 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'anxiété mesurée dans un labyrinthe en croix surélevé.	129
Figure 41 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le comportement exploratoire.	129
Figure 42 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le modèle d'AS durant la microdialyse.	131
Figure 43 : concentration de la corticostérone plasmatique totale et libre.	132
Figure 44 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur la concentration basale de corticostérone et sur la réactivité de l'axe corticotrope dans le CPF et l'HPC dorsal après un test de MDT.	133
Figure 45 : effets du rolipram sur l'anxiété.	143
Figure 46 : effets de l'augmentation du taux de corticostérone sur la MDT et les niveaux de phosphorylation de CREB, dans le CPF et le CA1 dorsal.	144
Figure 47 : effets de la metyrapone, sur la MDT et la phosphorylation de CREB.	146
Figure 48 : effets des antagonistes MR ou GR sur les performances d'AS.	148
Figure 49 : protocole du traitement au diazépam et effectifs des groupes expérimentaux.	154
Figure 50 : détail du sevrage et du traitement au diazépam.	155
Figure 51 : effets d'un traitement chronique au diazépam sur « l'anxiété ».	156
Figure 52 : effets du traitement au diazépam sur l'AS.	157
Figure 53 : effets du sevrage et du diazépam en conditions naïve (A) et test (B) sur la corticostérone plasmatique.	158
Figure 54 : effets du diazépam et du sevrage sur pCREB dans le CPF (A) et le CA1 dorsal (B) en condition naïve.	158
Figure 55 : effets du diazépam sur la phosphorylation de CREB.	159

Figure 56 : corrélations entre les performances de MDT et pCREB.....	160
Figure 57 : effets du traitement au diazépam sur l'AS.....	161
Figure 58 : effets du diazépam à court et long terme, sur les concentrations en corticostérone (ng/ml) au sein des groupes <i>Contrôle</i> et <i>Sevré</i>	162
Figure 59 : effets du sevrage et du traitement chronique au diazépam sur la concentration de corticostérone dans le CPF.....	163
Figure 60 : schéma simplifié de l'action des GCs sur CREB durant le sevrage à l'alcool via différents potentiels médiateurs intracellulaire.....	181

Liste des annexes

Annexe 1 : Alcoolémie.....	216
Annexe 2 : Quantification de la perte cellulaire.....	217
Annexe 3 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de rolipram.....	218
Annexe 4 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de Sp-cAMPS.....	219
Annexe 5 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de diazépam.....	220
Annexe 6: Poster IREB.....	221
Annexe 7: Poster de vulgarisation pour les Doctoriales.....	223
Annexe 8: Poster FENS.....	225
Annexe 9: Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone.....	227
Annexe 10: Rescuing prefrontal cAMP-CREB pathway reverses working memory deficits during withdrawal from prolonged alcohol exposure.....	239
Annexe 11: Long-lasting working memory disorders after alcohol-withdrawal are due to excessive corticosterone rise and alteration of CREB phosphorylation in the prefrontal cortex.....	253

Liste des abréviations

5-HIAA : acide 5-hydroxyindolacétique
11 β HSD : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
Ac-H3: histone 3 acétylée
Ac-H4: histone 4 acétylée
ACSF : Artificial cerebrospinal fluid
ACTH : Adrénocorticotrophine
AS : Alternance Spontanée
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
ATC : Antidépresseurs tricycliques
AVP : Arginine-vasopressine
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
CaMKIV : Protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes
CBG : Corticosteroid Binding Globulin
CBP : CREB Binding Protein
CA : Corne d'Ammon
CCA : Consommation Chronique d'Alcool
CPF : Cortex Préfrontal
CRE : cAMP Réponse Elément
CREB/pCREB : cAMP response element-binding / phospho-CREB
CRH : Corticotrophin Releasing Hormone
CRF: Corticotropin-Releasing Factor
DSM IV: Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders IV
ERK1/2: Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
GCs : Glucocorticoïdes
GD : Gyrus denté
GR : Récepteur GCs
GRE : Glucocorticoid Response Element
HAT : Histone Acétyl Transférase
HDAC : Histone Désacétylase
HHS : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
HPC : Hippocampe
HRE : Hormone Response Element
HSP: Heat Shock Protein
IEE : Intervalle Entre Essais
iMAO : Inhibiteurs de la Monoamine Oxydase

Ip : Intrapéritonéale
LCRa : Liquide Céphalo-Rachidien artificiel
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
MAPK : Mitogen-Associated Protein Kinase
MCT : Mémoire à Court Terme
MDT : Mémoire De Travail
MLT : Mémoire à Long Terme
MPMS : Multiple Parrallel Memory Systems
MR : Récepteur Minéralocorticoïde
MRE : Minéralocorticoid Response Element
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NPY : Neuropeptide Y
OMS : Organisation Mondial de la Santé
PB / TB / TBS : Tampons Phosphate, tris et tris salin
PDE-IV : Phosphodiesterase-IV
PKA : Protéine Kinase AMPc-dépendante
POMC : Protiomélanocortine
PVN : Noyau paraventriculaire
SCLI : Stress Chronique Leger Imprédictible
SERT : Transporteur de la sérotonine
SPI : Sériel, Parallèle et Indépendant

Introduction

Le cerveau a toujours fasciné les hommes, depuis l'Égypte antique jusqu'à aujourd'hui. L'idée que nos pensées, nos mouvements et nos affects sont contrôlés par le cerveau apparaît pour la première fois en Égypte entre le XXVIII^{ème} et le XXVI^{ème} siècle avant notre ère avec la découverte que le crâne contient un cerveau et que lorsque celui-ci est blessé l'individu « traîne des pieds ». Le lien entre le cerveau et la motricité du corps est établi. Hippocrate (-459 à -370) approfondit cette conception et y consacre un de ces principaux textes au cerveau. Il montre que cet organe est responsable du contrôle de la conscience, des sensations et du mouvement. La Renaissance et les premières dissections humaines dévoilent le cerveau dans sa réalité anatomique, André Vésale (1514-1564) décrit les hémisphères cérébraux, les circonvolutions, les ventricules, les vaisseaux sanguins, le tronc cérébral, les nerfs et leurs liens avec la masse cérébrale. Le lien entre les régions qui composent le cerveau et les fonctions physiologiques auxquelles elles correspondent se précise. Paul Broca (1824-1880) met notamment en lumière le centre de contrôle de l'élaboration du langage parlé au sein d'une région très précise : « le pied » de la troisième circonvolution de la région antérieure de l'hémisphère gauche en autopsiant le cerveau d'un patient présentant une perte complète de la faculté du langage. Par extension, Broca conclut que le fonctionnement du cerveau repose sur l'existence de zone spécialisée et dès lors, la conception de l'attribution d'une fonction à une partie du cerveau domine la recherche en neurosciences cognitives. Actuellement, la recherche cognitive se concentre, de plus en plus, sur l'étude des réseaux et sur la compréhension des interactions entre les structures et les fonctions cérébrales. La physiopathologie et l'étiologie permettent d'apporter un grand nombre de connaissances fondamentales sur la compréhension de ces mécanismes et sur les interactions fonctionnelles qui régissent les activités cognitives.

Comme nous le verrons par la suite, l'alcoolisme et le sevrage à l'alcool sont particulièrement intéressants dans l'étude des interactions entre les fonctions cognitives. En effet, au vu de l'action étendue de l'alcool sur les structures cérébrales impliquées dans les fonctions cognitives, cette pathologie se positionne comme un modèle de choix pour étudier les interactions entre la mémoire et les émotions. De plus, l'amélioration de la compréhension de l'effet de l'alcool sur le cerveau est une problématique majeure. En effet, l'alcoolisme est un enjeu de santé mondial grandissant, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. En 2012, la consommation d'alcool a entraîné 3.3 millions de décès dans le monde alors qu'en 2002, ce chiffre était de 1.8 millions d'après les *Global status report on alcohol and Health* (2004 et 2014). Dans ces mêmes rapports, le pourcentage de décès attribuables à la consommation d'alcool sur le nombre total de décès été estimé à 3.2% en 2002 ; dix ans plus tard, ce pourcentage est de 5.9%. En France, le coût de l'alcool atteint 17.6 milliards par an, si on inclut les problèmes de santé et les coûts indirects, pourtant seulement 8% des personnes ayant un problème avec l'alcool sont actuellement prises en charge.

Dans ce contexte global, notre étude a pour double objectifs d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathogéniques sous-jacents afin d'analyser les troubles cognitifs et neurobiologiques associés au sevrage à l'alcool, et de réduire les phénomènes de rechute par exemple.

Un des troubles majeurs associés au sevrage alcoolique étant caractérisé par l'augmentation du stress, nous avons également comparé l'effet du sevrage à celui résultant d'un stress chronique modéré. En effet, dans la perspective de la prise en charge pharmacologique, il importe de déterminer si le sevrage alcoolique est assimilable au stress chronique, ou bien s'il induit des troubles plus spécifiques.

Première partie :
Les émotions

A. Théories des émotions

1. Généralités

Une émotion est une réaction à un stimulus affectif, environnemental ou psychologique avec une composante subjective associée à des réactions biologiques objectives. En effet, lors d'une émotion, la composante subjective (agréable ou désagréable, consciente ou non) est associée à des composantes objectives ; répercussions physiques motrices (expressions faciales, tremblements, rires...) ou végétatives (tachycardie, tension artérielle, réaction vasomotrices...). Plusieurs théories ont tenté d'expliquer les liens très étroits qui existent entre le phénomène psychologique subjectif et les manifestations physiques et de déterminer si nous pouvions éprouver des émotions en l'absence d'activation des organes viscéraux.

Une question essentielle à ce champ d'investigation est posée par **William James**. Le point de départ de sa théorie repose sur la question suivante: « Fuyons nous devant un ours parce que l'on a peur ou bien avons-nous peur parce que nous nous enfuyons ? ». Pour lui, la seconde alternative est la bonne. Il affirmait que la sensation de peur est provoquée par l'activation physiologique globale causée par la réponse de fuite. En effet, James pensait que les modifications physiologiques survenaient en premier, et que c'est l'interprétation de ces signaux par le cerveau qui déclenchait la sensation subjective de l'émotion. Rapidement, cette théorie est soumise aux critiques, notamment par **Walter Cannon** qui s'appuie sur le fait que la plupart des émotions provoque les mêmes modifications physiologiques et que c'est l'émotion produite par le cerveau qui activerait la réponse physiologique. Au début des années 1960, la théorie de Cannon est précisée par **Schachter** qui affirme que la cognition est au centre de la perception des émotions ; ainsi l'évaluation cognitive du contexte dans lequel apparaît le stimulus et l'analyse des modifications physiologiques par le cerveau permettrait de colorer émotionnellement ce stimulus.

2. Fonctions des émotions

Les émotions ont une **fonction préparatoire** permettant de survivre dans l'environnement (la peur permet de fuir un danger), et de préparer le corps à l'action ou à un comportement spécifique (mobilisation de ressources). D'autre part, les émotions permettent de **communiquer** avec ses congénères et de montrer aux autres ce que nous ressentons (postures, gestes, expressions faciales, intonations ...).

Les émotions sont également indispensables au processus de raisonnement et permettent d'apporter une information complémentaire lors d'une prise de décision. Damasio est le premier à formaliser cette théorie avec l'hypothèse des marqueurs somatiques (Eslinger and Damasio, 1985). Sur la base du cas de Phineas Gage (Fig. 1), de son crâne exhumé et des modifications comportementales engendrées par la lésion de ses lobes frontaux par une barre de fer, Antonio et Hanna Damasio conclurent que « **Son cerveau ne faisant plus le lien entre raison et émotion...** ». Par la suite Damasio a mis en évidence qu'une lésion du cortex préfrontal (CPF) (en particulier sur la partie ventro-médiane) avait deux conséquences : une **difficulté à prendre des décisions** et un **déficit émotionnel**.

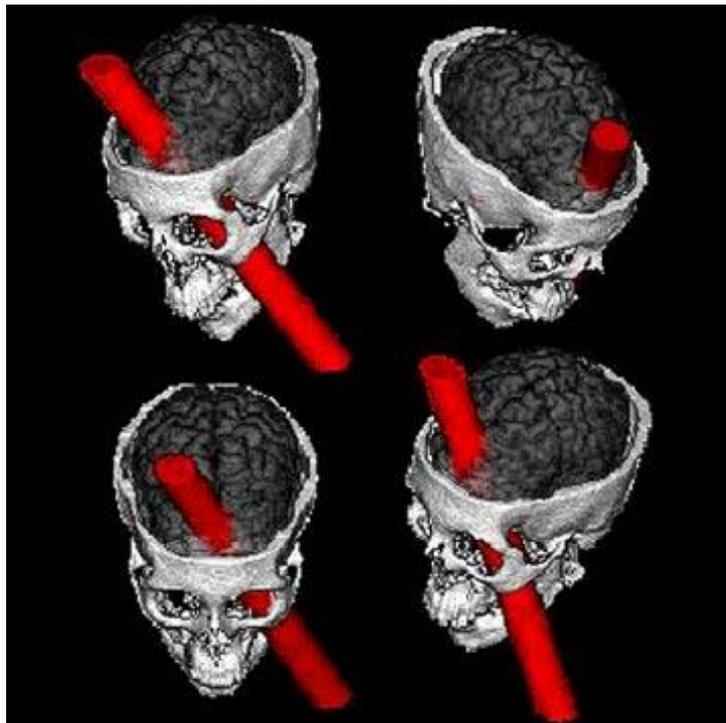


Figure 1 : illustration des lésions cérébrales de Phineas Gage dans le cortex préfrontal.

Longtemps le grand lobe limbique a été décrit comme le substrat anatomique des émotions. **Paul Broca** le décrit pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle. Le concept anatomo-fonctionnel du lobe limbique de Broca n'a cessé d'être révisé par la suite. En 1937, **Papez** a adjoint au lobe limbique des structures sous-corticales impliquées dans les réponses émotionnelles. Le circuit de Papez ou circuit hippocampo-mamillo-thalamique connecte la formation hippocampique aux corps mamillaires grâce au fornix. De là, l'information rejoint le noyau antérieur du thalamus par le tractus mamillo-thalamique, puis le cortex cingulaire (via la capsule interne). A partir de celui-ci, les informations rejoignent le cortex entorhinal grâce au cingulum avant de retourner vers l'hippocampe (HPC).

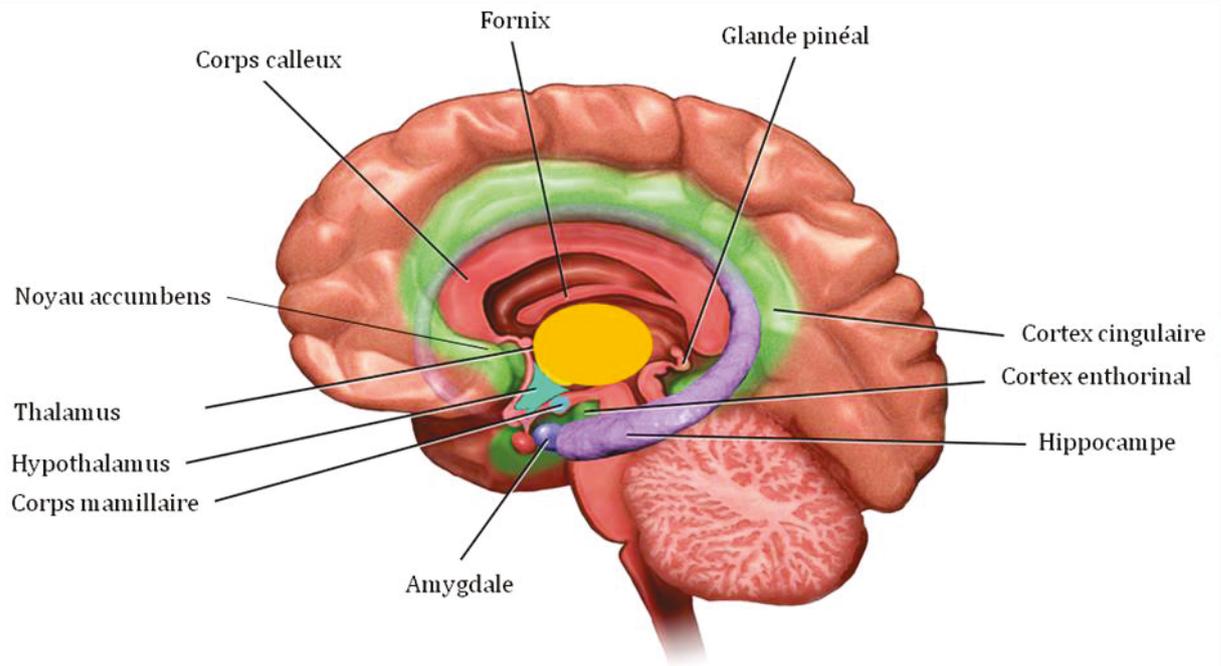


Figure 2 : structures impliquées dans le système limbique.

À présent, la notion de système limbique s'est enrichie et complexifiée. Les structures qui constituent le système limbique collaborent à la réalisation de quatre grandes fonctions : l'homéostasie, l'olfaction, la mémoire et l'émotion. Dans sa conformation actuelle (**Fig. 2**), il englobe l'HPC, les cortex entorhinal et cingulaire, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, les noyaux septaux, le noyau accumbens, le rhinencéphale et l'insula. Bien qu'initialement non incluse dans le système limbique, l'amygdale est en réalité la structure essentielle à l'interprétation émotionnelle des informations sensorielles. La connexion de l'amygdale avec le CPF permet d'assigner une signification cognitive aux émotions et guide les comportements complexes. L'amygdale participe aussi activement aux processus de mise en mémoire des émotions et des expériences émotionnellement connotées.

B. Le stress

1. Le concept de stress

L'étude des émotions a conduit les recherches vers l'investigation des effets du stress sur le comportement. Etymologiquement le mot anglais « stress », provient du latin « stringere » qui signifie mettre en tension. Ce mot désigne la force exercée sur un corps qui le contraint ou le déforme. Le stress est un concept introduit par **Selye (1956)** pour définir la réponse physiologique d'un organisme en situation de détresse. Cette réponse permet à l'individu de s'adapter aux changements de l'environnement. Néanmoins, la réaction émotionnelle induite par l'exposition à un agent stressant est une réponse complexe qui varie en fonction des individus, des expériences passées, du contexte environnemental et interne à l'organisme. Pour Selye, la réponse au stress n'est donc pas caractéristique de la nature du stressor mais est au contraire aspécifique et n'a pour seul but que de rétablir l'équilibre homéostatique. Il parle d'un « **syndrome général d'adaptation** », qui s'articule en trois phases :

- Durant la **phase d'alarme**, le stress entraîne une double activation (périphérique et centrale) induisant la synthèse d'hormones et de neuromédiateurs de l'axe du stress notamment les **catécholamines** (adrénaline et noradrénaline). L'activation *périphérique* entraîne la synthèse de l'adrénaline et de la noradrénaline par les surrénales. Ces messagers hormonaux hydrosolubles sont responsables des effets stimulants sur l'organisme et conduisent à la mobilisation d'énergie afin de lutter ou de fuir face à la contrainte extérieure (fight or flight). Ils activent également les régions cérébrales via le locus coeruleus. La deuxième activation dite *centrale* est engendrée par l'hypothalamus qui active directement plusieurs régions cérébrales via le locus coeruleus.
- une **phase de résistance** : le système endocrinien, par l'axe corticotrope, intervient dans un second temps : il permet la restauration de l'homéostasie ou la réaction adaptative si le stimulus persiste grâce à la sécrétion de **glucocorticoïdes** (GCs).
- une **phase d'épuisement** : les effets physiologiques neuroendocriniens du stress doivent s'interrompre ; cela est rendu possible par des boucles de rétrocontrôle négatives de l'axe corticotrope. Dans le cas d'une exposition chronique au stress ou de forte intensité, l'organisme ne peut plus faire face.

Le stress déclenche donc une réponse complexe avec une chaîne de réaction, qui affecte différents niveaux d'organisation (neuroendocrinien, cellulaire, réseau cérébral). La réponse au stress est régulée avec une importante dynamique temporelle permettant la réaffectation des ressources selon les besoins cognitifs. Les catécholamines et les GCs (**Fig. 3A**) secrétés après le stress vont exercer des effets modulateurs sur l'excitabilité neuronale et la plasticité avec une grande spécificité temporelle et locale (**Fig. 3B**) (Joels, 2006, Joels and Baram, 2009, Arnsten et al., 2012). Les catécholamines exercent, immédiatement après le stress leurs actions via des récepteurs couplés aux protéines G ; dans un second temps, les GCs induisent des effets non-génomiques rapides pouvant interagir avec ceux des catécholamines avant d'exercer des effets génomiques plus tardifs. Au niveau des réseaux cérébraux (**Fig. 3C**), les neuromodulateurs produisent des effets distincts permettant de détecter rapidement une menace et d'y répondre de manière adéquate. Cependant, le stress induit, en parallèle, des difficultés de concentration, d'attention, de prise de décision ainsi que des troubles de la mémoire. Ce clivage s'explique notamment dans le modèle proposé par Hermans (2014), qui décrit un recrutement biphasique et réciproque de deux réseaux neurocognitifs différents: le réseau de salience (traitement de stimuli saillants) et le réseau exécutif (traitement de tâche complexe) (Seeley et al., 2007, Menon, 2011). Ces effets opposés se produisent en raison des différences dans la distribution des récepteurs entraînant une réallocation dynamique des ressources. L'activité du réseau de salience est stimulée au cours de la phase aiguë du stress, au détriment du réseau exécutif, avant de revenir à l'homéostasie, expliquant de ce fait la grande variabilité observée dans les effets du stress sur la cognition.

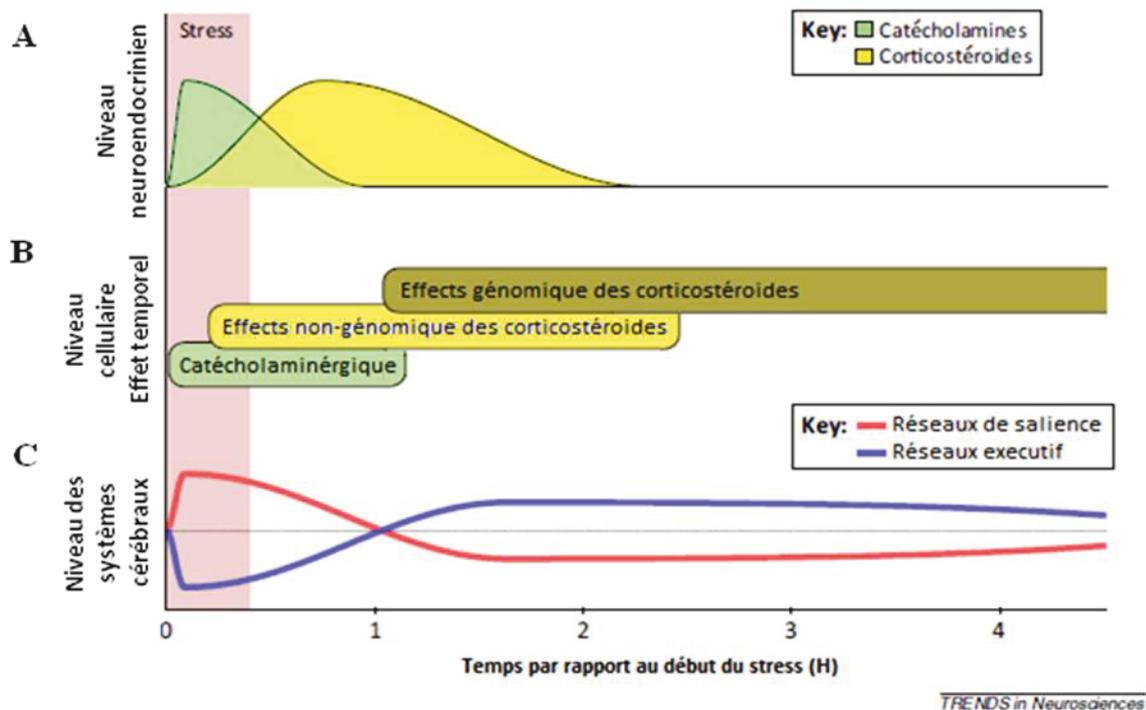


Figure 3 : modèle biphasique et réciproque de réallocation des ressources neuronales en réponse à un stress, selon Hermans (2014).

Au niveau neuroendocrinien, à la suite d'un stress les niveaux de catécholamines (adrénaline, norépinephrine, dopamine...) augmentent rapidement avant d'être normalisés après 1 heure. Les taux de GCs augmentent plus lentement et restent élevés pendant une longue période (jusqu'à 2 heures). Au niveau cellulaire, les effets du stress sont temporellement distincts avec l'action rapide des catécholamines puis l'action non génomique des GCs, qui induisent également à long terme des effets génomiques. Au niveau des réseaux neuronaux, le stress recrute, dans un premier temps, le réseau de salience, au détriment du réseau exécutif induisant des troubles de l'attention, de mémoire ou de prise de décision.

2. Physiologie de l'axe corticotrope

a. Organisation fonctionnelle

Le stress provoque le plus souvent la libération immédiate de neurotransmetteurs catécholaminergiques (dont l'adrénaline), suivie par la mise en jeu de l'axe corticotrope. Malgré le grand nombre d'acteurs impliqués dans les effets du stress, nous nous intéresserons plus en détails à l'axe corticotrope reconnu pour ses effets modulateurs sur les capacités cognitives et pour son implication dans le syndrome de sevrage à l'alcool.

L'axe corticotrope (**Fig. 4**) ou axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS) constitue un système neuroendocrinien majeur aboutissant à la libération dans la circulation sanguine des hormones GCs, responsables de la plupart des effets physiologiques de l'activation de l'axe corticotrope (Dallman et al., 1989, McEwen, 2007). Il est composé de trois structures principales en interaction : l'hypothalamus, l'antéhypophyse et les glandes surrénales.

Le point de départ de l'axe corticotrope est l'**hypothalamus** et plus précisément le noyau paraventriculaire (PVN), centre intégrateur de l'axe qui reçoit les afférences provenant des centres supérieurs, notamment celles du système limbique (Gray et al., 1989). En réponse aux stimulations, le PVN produit et libère des peptides hypothalamiques hypophysiotropes : la corticolibérine et l'arginine vasopressine (AVP). La **corticolibérine** ou **CRH** (*Corticotropin Releasing Hormone* ou CRF) est un neuropeptide de 41 acides aminés, synthétisée dans les neurones parvocellulaires du PVN. Ces neurones projettent sur la couche externe de l'éminence médiane jusqu'au système porte hypothalamo-hypophysaire, lieu de sécrétion des hormones hypothalamiques. La CRH, ainsi libérée peut alors agir sur les cellules corticotropes situées dans l'**hypophyse** et activer la transcription du gène codant pour la proopiomélanocortine (POMC), un peptide de 241 acides aminés, précurseur de l'**hormone adrénocorticotrope** ou **ACTH**, un peptide de 39 acides aminés (Riniker et al., 1972). L'ACTH une fois libérée dans la circulation sanguine, agit alors sur les cellules du cortex surrénalien de la **glande surrénale** pour activer la synthèse des **hormones GCs** (cortisol chez l'homme, corticostérone chez le rongeur) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires couplés à l'adénylate cyclase.

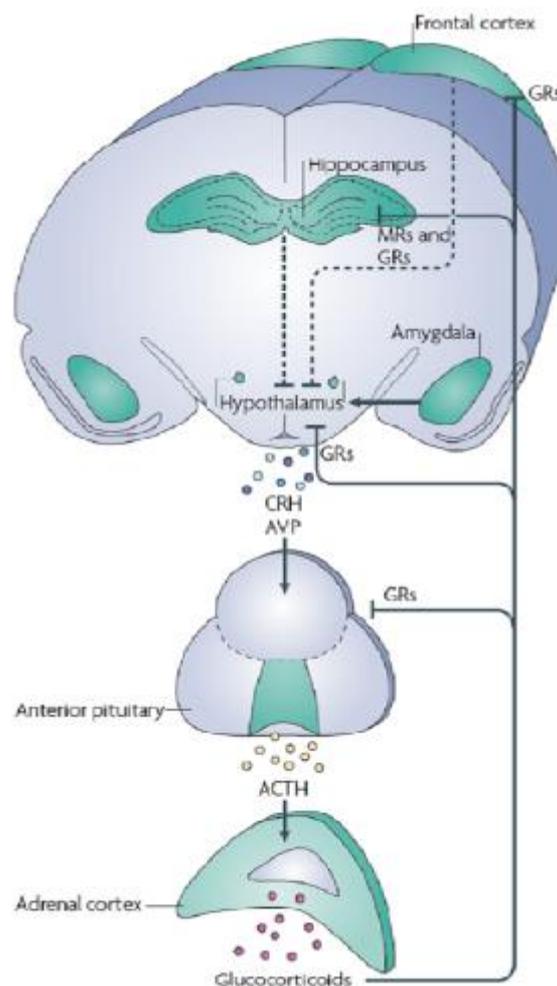


Figure 4 : organisation fonctionnelle de l'axe corticotrope, d'après Lupien et al 2009

b. Rétrocontrôle négatif

Les GCs sont aussi capables de réguler leur propre sécrétion en exerçant un **rétrocontrôle négatif** sur les structures de l'axe corticotrope possédant des récepteurs aux GCs : structures du système limbique (HPC, CPF, amygdale), hypothalamus, hypophyse. Il a notamment été montré que les neurones hippocampiques activent un réseau GABAergique qui inhibe les neurones du PVN (Jacobson and Sapolsky, 1991, Herman et al., 2003, Cullinan et al., 2008) et donc la sécrétion de CRH ainsi que la libération d'ACTH. Le CPF dorso-médian et le cortex prélimbique exercent également un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope (Jankord and Herman, 2008, Ulrich-Lai and Herman, 2009). Ce rétrocontrôle négatif a pour but de limiter la production de l'hormone dans le sang et ainsi limiter la durée d'exposition des tissus cibles aux GCs, délétères à long terme pour l'organisme. Le rétrocontrôle négatif peut être de trois types :

- Rapide en inhibant la libération d'ACTH via la CRH
- Intermédiaire en inhibant la libération d'ACTH sans effet sur sa production
- Tardif (3h à plusieurs jours) dans le cas d'une hypercortisolémie importante et prolongée. Les GCs inhibent les mécanismes de synthèse du CRH, de l'ACTH ainsi que la synthèse des récepteurs.

Au niveau hypothalamique, l'ACTH exerce également un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH et donc sur la sécrétion même de l'ACTH (Aguilera, 1994).

c. Cycle nyctéméral

L'axe corticotrope présente une rythmicité circadienne et ultradienne. En condition basale, l'activité de l'axe corticotrope est rythmée par l'alternance jour-nuit appelée cycle nyctéméral ou circadien de 24 heures (**Fig. 5**) (de Kloet and Sarabdjitsingh, 2008). Ce rythme est coordonné aux signaux externes jour/nuit détectés par les noyaux supra-chiasmatiques de l'hypothalamus et à d'autres stimulations de l'environnement telles que la prise alimentaire (Follenius et al., 1982). Le début de la phase active (le matin chez l'Homme ; le soir chez le rongeur) est précédé d'un pic circadien de sécrétion d'AVP et de CRH puis d'ACTH et enfin des GCs. Ce pic circadien permet une réaction anticipatrice au moment du réveil. Les GCs permettent ainsi de mobiliser les substrats énergétiques nécessaires à la période d'activité. Les taux d'hormones diminuent ensuite progressivement tout le long de la phase d'activité jusqu'à la période de sommeil, où les besoins énergétiques de l'organisme sont plus faibles.

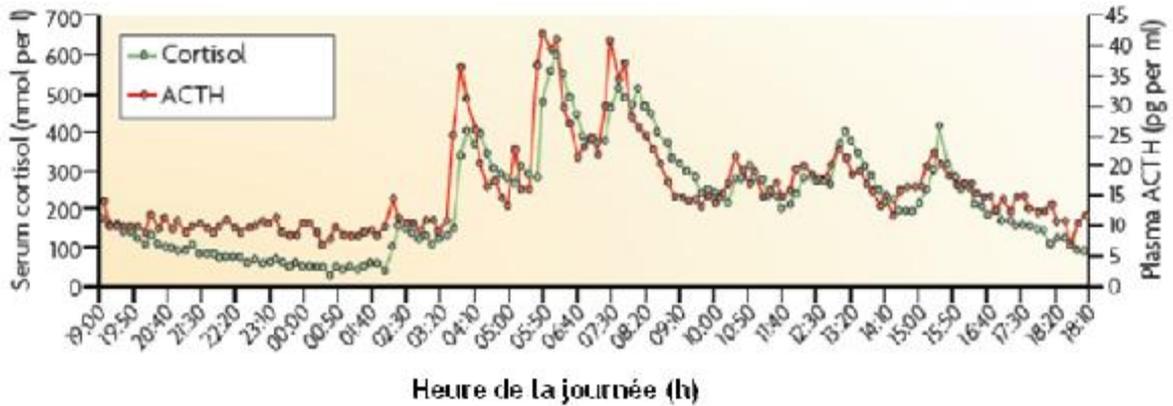


Figure 5 : sécrétion circadienne du cortisol et de l'ACTH (Windle et al., 1998a, Henley et al., 2009). Représentation de la relation temporelle entre la sécrétion d'ACTH et du cortisol chez l'homme sur 24h.

Le CRH, l'AVP, l'ACTH et les GCs présentent également une sécrétion ultradienne de type pulsatile (**Fig. 6**) avec des épisodes sécrétoires de 1 à 3 pulses par heure, d'amplitude variable, suivit d'une phase d'inhibition qui permet la clairance de ces hormones (Windle et al., 1998a, Windle et al., 1998b). Cette rythmicité est observée dans de nombreuses espèces incluant les rongeurs (Young et al., 2004, Engeland and Arnhold, 2005). La sécrétion pulsatile permettrait d'éviter la désensibilisation des récepteurs et donc la constante activité des hormones dans le but de maintenir l'équilibre homéostatique (Lightman and Conway-Campbell, 2010).

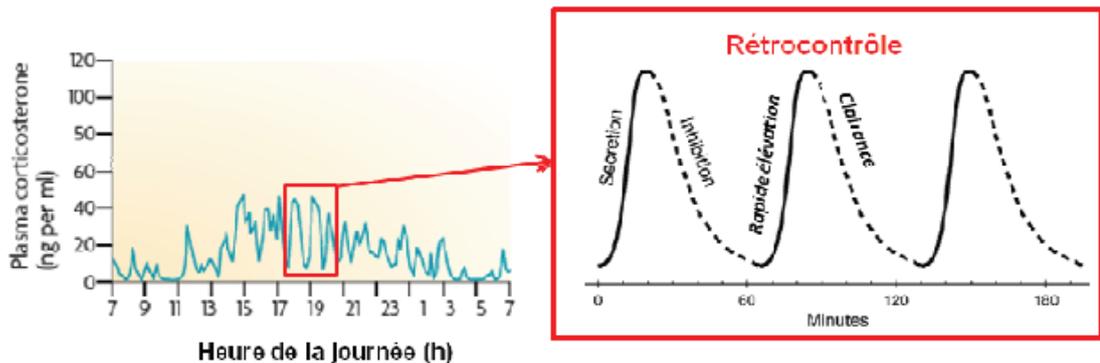


Figure 6 : sécrétion ultradienne de la corticostérone. Représentation des pulsations sécrétoires sur 24h chez le rat. Une pulsation dure environ 1h et se découpe en une phase de sécrétion qui précède une phase d'inhibition.

3. Les glucocorticoïdes

a. Biosynthèse des glucocorticoïdes

Les hormones GCs sont des hormones stéroïdiennes. Leur biosynthèse a lieu dans la zone fasciculée du cortex des glandes surrénales et est initiée par la fixation de l'ACTH sur les récepteurs surrénaux. Cette biosynthèse se fait à partir du cholestérol (**Fig. 7**), provenant soit de la synthèse

hépatique soit de l'absorption intestinale, qui subit une série de réactions enzymatiques. Comme tous les stéroïdes, les GCs sont lipophiles. Ainsi, ils ne sont pas stockés dans la cellule mais sont immédiatement libérés dans la circulation générale après leur synthèse. Cette propriété leur confère la capacité de traverser la bicouche lipidique des cellules et la barrière hématoencéphalique pour se lier à leurs récepteurs, de type minéralocorticoïde (MR) ou glucocorticoïde (GR). La propriété lipophile leur permet également de pénétrer facilement dans le cerveau sous forme libre.

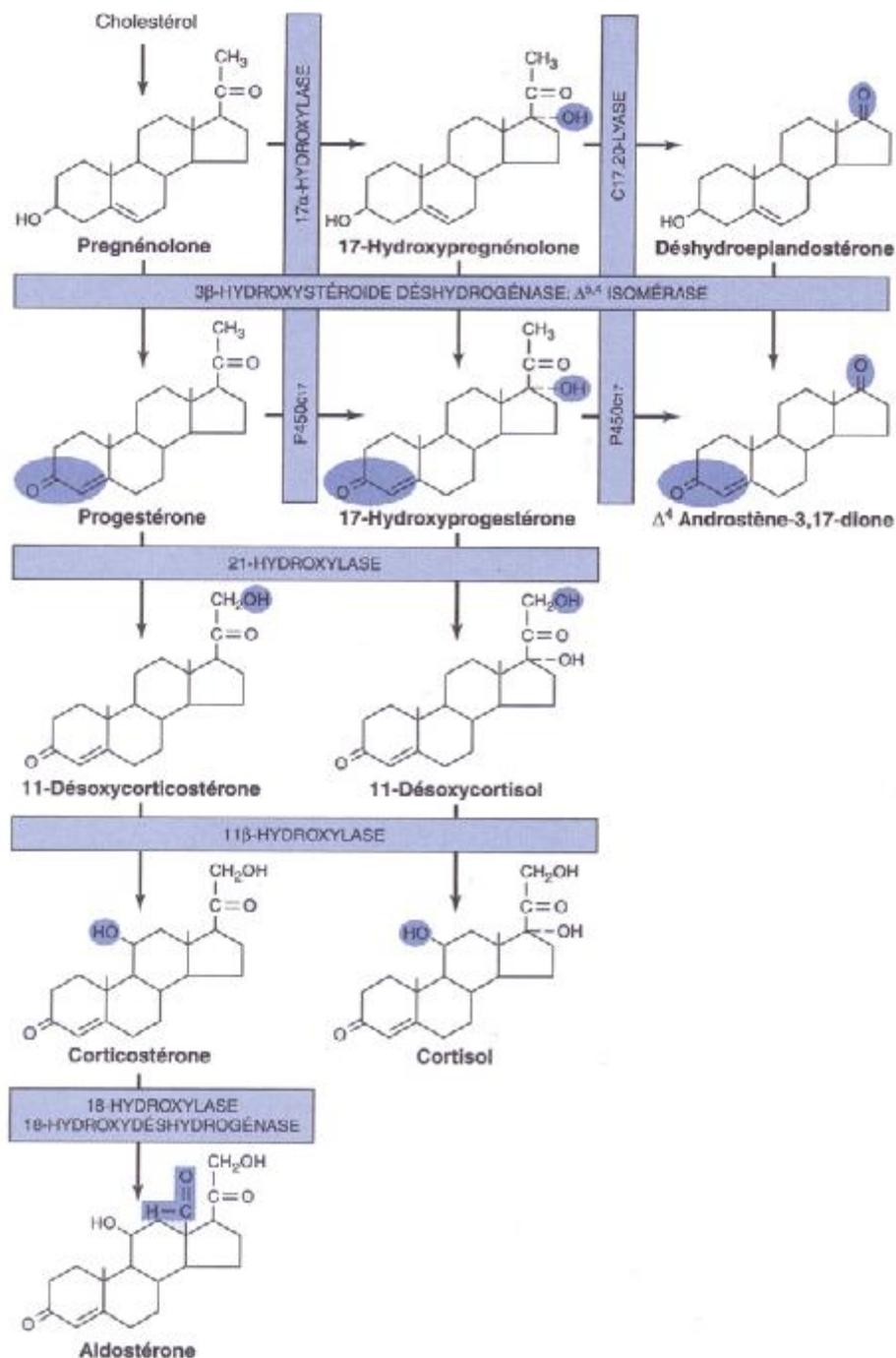


Figure 7 : biosynthèse de la corticostérone.
La corticostérone et le cortisol sont synthétisés à partir du cholestérol.

b. Circulation et métabolisme des glucocorticoïdes

Au niveau tissulaire, la concentration des GCs est sous le contrôle de 2 isoenzymes : le 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) de types 1 et 2. Ces enzymes catalysent les réactions d'interconversion des hormones actives (cortisol ou corticostérone) ainsi que de leurs homologues inactifs 11-céto (cortisone ou 11-déhydrocorticostérone).

Les types 1 et 2 de 11 β HSD sont présents dans le réticulum endoplasmique où ils ont respectivement une activité NADP(H) et NAD dépendante.

La 11 β HSD de type 1 a une activité enzymatique bidirectionnelle, elle possède à la fois une action déshydrogénase (actif \rightarrow inactif) et une action réductase (inactif \rightarrow actif), largement prédominante. Elle est présente dans de nombreux tissus, le foie, les poumons, les tissus adipeux, les gonades, les os, les yeux, les muscles lisses vasculaires, la peau et le système central (Seckl and Walker, 2001, Walker and Stewart, 2003, Seckl et al., 2004).

La 11 β HSD de type 2 catalyse exclusivement les réactions de type déshydrogénase : elle inactive le cortisol ou la corticostérone en cortisone ou 11-déhydrocorticostérone respectivement. Cette enzyme est présente dans les tissus cibles de l'aldostérone (les glandes salivaires, les glandes sudoripares, les reins ou le côlon) afin de protéger les récepteurs MR de l'occupation prédominante des récepteurs GCs qui sont 100 fois plus abondant. La 11 β HSD2 est également exprimée dans le placenta et les tissus du fœtus afin de protéger les récepteurs de l'action des GCs maternels in utero (Seckl, 1997).

La demi-vie du cortisol est de 60 à 90 minutes et celle de la corticostérone de 50 minutes. La majorité du cortisol est réduite et conjuguée dans les cellules cibles et le foie avant d'être excrétée dans les urines sous forme glucuronides. La partie non dégradée est éliminée directement sous forme libre via l'urine.

En condition basale, les GCs une fois libérés dans la circulation sanguine, se lient avec une forte affinité à la **transcortine** (~80-85%), encore appelée **CBG** (Corticosteroid Binding Globulin), une glycoprotéine plasmatique synthétisée par les hépatocytes et à l'albumine (~15%) de manière non spécifique. La fraction d'hormone circulante restante (~5%) constitue la forme libre des GCs (Dunn et al., 1981, Siiteri et al., 1982, Breuner and Orchinik, 2002). Selon l'hypothèse de Mendel, seule la fraction libre est active (Mendel, 1989) et agit sur les tissus cibles, en se liant à ses deux récepteurs ; les récepteurs MR ou les récepteurs GR. En revanche, la forme liée constituerait une réserve plasmatique biodisponible de l'hormone par la séquestration des GCs dans un complexe inactif. La CBG est souvent décrite comme une protéine permettant la régulation de la montée des GCs et leur libération dans les tissus cibles en réponse à un stress. Chez la souris, la capacité de liaison de la CBG est de 20 ng/ml tandis qu'en condition basale, les valeurs physiologiques des GCs sont de 15 ng/ml environ. Ainsi la capacité de liaison de la CBG est très vite dépassée et son rôle de tampon est donc

très limité dans le temps car, par exemple, les concentrations de GCs atteignent 80 ng/ml lors d'un stress de nage forcée.

Cependant, un stress induit également une augmentation rapide (5 minutes) de la libération de CBG par le foie ; sa capacité de fixation est ainsi augmentée, permettant de freiner la hausse de concentration de corticostérone libre pendant environ 20 minutes. L'augmentation de la CBG induite par le stress semble être spécifique des stress modérés et forts. En revanche, lors d'un stress léger d'exposition à la nouveauté, les niveaux de CBG ne sont pas modifiés. Ces données démontrent un rôle très dynamique de la CBG dans la régulation de la physiologie de l'hormone GCs après un stress aigu (Qian et al., 2011). L'augmentation retardée de la corticostérone libre permettrait l'initiation des mécanismes physiologiques de défense de l'organisme, comme le système immunitaire, avant d'être inhibés par les GCs. Les techniques de microdialyse *in vivo* ont permis de mettre en évidence l'augmentation retardée de la corticostérone au niveau cérébral et notamment de l'HPC, en mesurant l'évolution des concentrations de corticostérone en condition basale et après un stress. Le pic de corticostérone est ainsi détecté 20 à 30 minutes après l'apparition du pic de corticostérone dans le plasma et est maintenu dans l'HPC, permettant au cerveau d'adapter la réponse au stress (Dorey et al., 2012, Moisan et al., 2014).

En réponse au stress, et à l'inverse de ce que supposaient **Cannon** et **Selye**, l'ampleur de la réponse des GCs suite à l'activation de l'axe corticotrope est dépendante du type de stress et de sa valence émotionnelle. Une étude réalisée chez le rat a comparé la réactivité à divers types de stressseurs (Koolhaas et al., 1997, Koolhaas et al., 2011). Ces stressseurs sont de type aversifs (stimuli douloureux ou émotionnellement traumatisant comme la défaite sociale ou l'immersion forcée sous l'eau) ou appétitifs (stimuli de type récompense comme le comportement sexuel ou la victoire lors d'une interaction sociale). Les résultats ont montré que dans la plupart des cas l'intensité de la réactivité des GCs au stress est le reflet direct de l'activité comportementale et des besoins métaboliques associés.

c. Récepteurs aux glucocorticoïdes

Les GCs agissent sur des cellules cibles par l'intermédiaire de deux types de récepteurs intracellulaires : les récepteurs MR (ou récepteur de type 1) et les récepteurs GR (ou récepteur de type 2) (Bamberger et al., 1996). Les MR lient le cortisol avec une forte affinité (constante de dissociation : $K_d=0.5-1\text{nM}$). Les GR lient les GCs endogènes avec une affinité dix fois moins importante que les MR ($K_d=2.5-5\text{nM}$). Du fait des différences d'affinité des MR et des GR, la saturation des GR n'a lieu qu'en cas d'hypersécrétion des GCs. Les MR sont donc impliqués dans l'activité basale de l'axe corticotrope alors que les GR sont impliqués dans la réponse au stress (de Kloet et al., 2005).

Les GR ont deux sous-types, les GR α et les GR β . Le variant alpha, localisé dans le cytoplasme, active la transcription génique une fois lié avec son ligand. Le variant bêta, localisé dans le noyau, possède un domaine C terminal tronqué permettant d'inhiber sa liaison avec le ligand. Cette

propriété permet de diminuer la transactivation du GR α et joue un rôle important dans l'immuno-modulation, il pourrait participer à la mise en place d'une insensibilité et d'une résistance aux GCs dans certains types cellulaires et pathologies (DeRijk et al., 2002). Les récepteurs aux GCs ont une demi-vie relativement longue de 20 à 30 heures en l'absence de ligand et moitié moins en sa présence (Dong et al., 1988).

Les récepteurs ne sont pas distribués uniformément dans les tissus. Au niveau du système nerveux central, des études d'hybridation *in situ* et d'analyse par microscopie ont permis de localiser les GR et les MR. Les MR sont majoritairement exprimés au sein du CPF, de l'amygdale (noyaux central et médian), du septum latéral et au sein des noyaux thalamiques et hypothalamiques (Patel et al., 1989, Han et al., 2005). Les GR sont largement exprimés dans tout le cerveau. Cependant, dans l'HPC les récepteurs MR et GR sont particulièrement colocalisés (Robertson et al., 2005) mais inégalement repartis. En effet, les MR sont plus abondants que les GR dans l'HPC dorsal (régions du CA1, CA2, CA3 et le gyrus denté) et ventral (région du CA3) (Van Eekelen et al., 1988, Van Eekelen and De Kloet, 1992). La localisation des GR se limite aux régions du CA1, CA2 (de l'HPC dorsal et ventral) et du gyrus denté (Van Eekelen et al., 1988). La colocalisation des MR et des GR a également été mise en évidence dans les noyaux des neurones pyramidaux et des cellules granulaires (Van Eekelen et al., 1988, Van Eekelen and De Kloet, 1992, van Steensel et al., 1996). L'expression hétérogène des récepteurs aux GCs pourrait rendre compte des effets contrastés du stress dans les différentes régions cérébrales.

Mécanismes génomiques

Les récepteurs nucléaires MR et GR sont des facteurs de transcription ; ils régulent l'expression de nombreux gènes cibles (Zhou and Cidlowski, 2005, Lu and Cidlowski, 2006). Ils sont phylogénétiquement proches et font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et de la famille des récepteurs aux stéroïdes (Beato and Klug, 2000). Ils sont composés de cinq domaines spécifiques (**Fig. 8**) :

- La partie A/B, en N-terminale contient les séquences responsables de l'activation des gènes cibles et interagit avec les facteurs de transcription.
- Le domaine C est composé de deux doigts de zinc, il permet la fixation à l'ADN.
- Le domaine D impliqué dans la fixation à l'ADN et dans l'adressage du récepteur dans le noyau
- La partie E est responsable de la liaison au ligand ainsi qu'aux protéines chaperonnes et aux co-activateurs. Il contient également une fonction activatrice de la transcription.
- Le domaine F, en C-terminal est une région de fixation du ligand

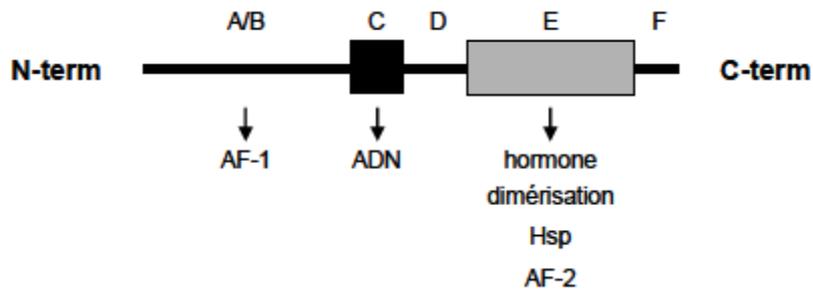


Figure 8 : principaux domaines composant les récepteurs MR et GR (Beato et Klug, 2000).

Les récepteurs sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexe multiprotéique comprenant deux protéines de choc thermique hsp90 (Heat Shock Protein) ainsi que des protéines hsp 70 et 50. La liaison des GCs (**Fig. 9**) au récepteur induit son activation via un changement conformationnel et son hyper-phosphorylation provoque la dissociation du complexe multiprotéique. Les récepteurs peuvent se complexer en homodimères (GR/GR ou MR/MR) ou en hétérodimères (GR/MR). Le ligand toujours lié au récepteur est ensuite transloqué dans le noyau à l'aide de protéines de translocation nucléaire recrutées par la libération de signaux spécifiques lors du changement de conformation. Les récepteurs peuvent alors agir en se liant à l'ADN sur les séquences HRE (Hormone Response Elements) telles que les GRE (Glucocorticoid Response Elements) ou les MRE (Mineralocorticoid Response Elements). L'action des GCs peut selon le type de promoteur induire l'expression ou l'inhibition de l'expression de protéines.

Les GCs peuvent également agir via des interactions protéine-protéine à l'état de monomère notamment avec d'autres facteurs de transcription et ainsi réguler l'expression de gènes ne contenant pas de HRE.

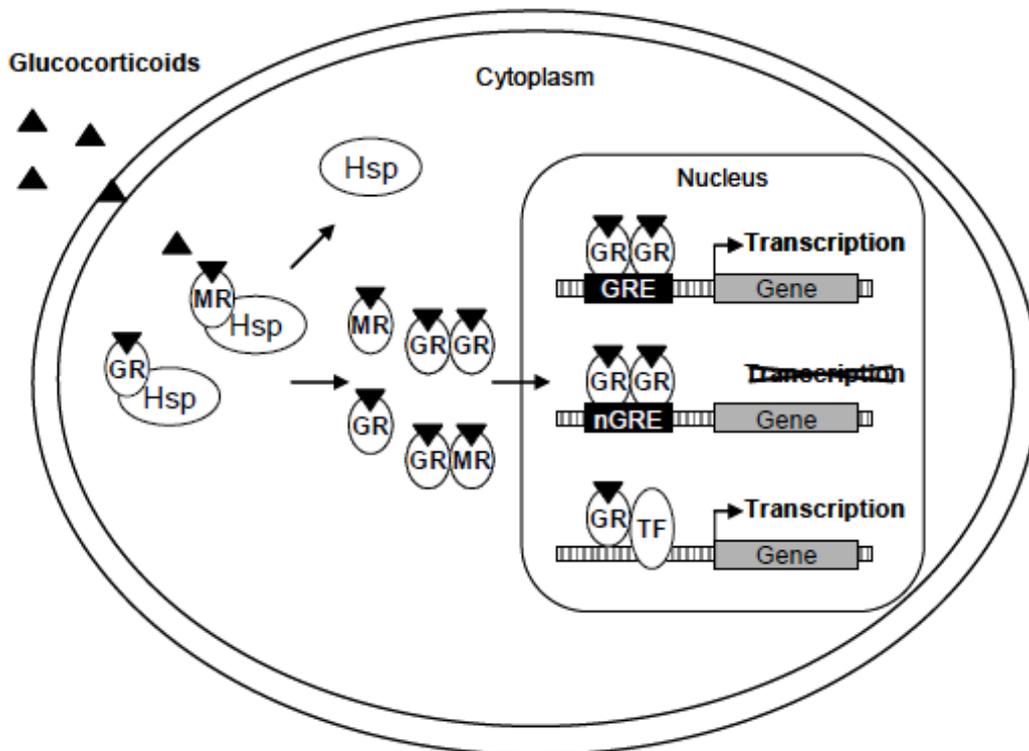


Figure 9 : mécanisme d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes.

Les GCs rentrent dans le cytoplasme de la cellule et se fixent sur les récepteurs aux corticostéroïdes. Une fois dissociés des HRP, les récepteurs se dimérisent ou interagissent avec des facteurs de transcription et se lient à l'ADN afin d'activer ou d'inhiber la transcription.

Le délai d'action des GCs par la voie génomique est au minimum de 15 minutes (la translocation nucléaire est comprise entre 10 et 30 minutes, la transcription et traduction entre 5 et 120 minutes) ; pourtant, il a été reporté des délais d'actions des GCs plus courts dans la littérature. Ces données ont permis de suggérer l'existence de mécanismes d'action non génomiques (Buckingham, 2006).

Mécanismes non génomiques

Des récepteurs MR sont également localisés dans les membranes plasmiques (Tasker et al., 2006, Joels et al., 2008). Contrairement aux récepteurs MR nucléaires, ils ont une faible affinité pour les GCs, comparable à celle de GR (Karst et al., 2005). Ils sont donc activés par de fortes concentrations en GCs. Ces récepteurs MR sont responsables des effets rapides non-génomiques et auraient un délai d'intervention court (5 minutes) après le stress (Karst et al., 2005, Olijslagers et al., 2008). Les premières études ont démontré qu'ils pourraient agir en augmentant la neurotransmission glutamatergique (Karst et al., 2005) facilitant ainsi la transmission et la plasticité synaptique dans l'HPC. L'action rapide serait liée à des mécanismes de signalisation intracellulaire (tels que le couplage des récepteurs classiquement connu). Ce mode d'action est impliqué dans les processus mnésiques (Tasker et al., 2006). Cette première vague d'action va permettre une adaptation optimale

pour faire face au stresser grâce aux fonctions cérébrales supérieures, impliquant notamment le **CPF**, qui en augmentant la vigilance, l'éveil émotionnel et l'attention permet le traitement des informations reçues et la prise de décision. Cependant, les MR ne sont pas les seuls récepteurs membranaires impliqués dans les effets non-génomiques. En effet, les récepteurs GR ont également été identifiés comme récepteurs membranaires pré-synaptiques. Ils seraient impliqués dans les effets rapides non génomiques (20 min) (Xiao et al., 2005). En effet, il a été observé que l'injection d'un agoniste GR engendre une augmentation rapide des courants inhibiteurs post-synaptiques dans les neurones pyramidaux du CA1 de l'HPC. Cet effet est engendré par l'activation non-génomique des GR (Hu et al., 2010).

A forte concentration, les GCs peuvent également altérer les propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire sans intervention des récepteurs (Falkenstein et al., 2000, Stellato, 2004). Par exemple, les GCs peuvent moduler la liaison de la calmoduline avec les membranes en augmentant leur présence dans les vésicules synaptiques et activer les canaux calciques voltage-dépendants.

d. Actions des glucocorticoïdes

Dans ce manuscrit, l'ensemble des actions des GCs ne sera pas détaillé au vu du grand nombre d'implications des GCs dans l'organisme. Ils agissent, en effet, sur la croissance et le développement, sur le métabolisme des protéines, des lipides et des sucres, sur le système immunitaire et inflammatoire et également sur le système nerveux central sur lequel nous nous focaliserons.

L'action des GCs sur le système nerveux central est multiple. De manière générale, il a été montré que les GCs sont impliqués dans divers aspects du comportement tels que le sommeil (Born et al., 1989), la mémoire et les apprentissages (Chauveau et al., 2010, Schwabe et al., 2010a, Schwabe et al., 2010b), l'humeur (Lupien and McEwen, 1997) ou l'appétit (Sapolsky, 2000). En cas de dérégulation de la libération de GCs en réponse au stress, l'ensemble de ces fonctions peut être perturbé. Les GCs sont donc impliqués dans la mise en place d'un certain nombre de troubles et de pathologies. Une hyperactivité de l'axe corticotrope augmente le développement de nombreux troubles tels que l'insomnie (Buckley and Schatzberg, 2005), des perturbations de l'humeur (anxiété exacerbée, dépression) (De Kloet et al., 1998, Pariante and Lightman, 2008), des troubles de la mémoire, l'obésité (Kyrou and Tsigos, 2009), les psychoses et la paranoïa (Brunner, 1997) ou encore l'addiction (Koob and Le Moal, 2001). De même, une altération de l'activité de l'axe corticotrope serait un facteur déterminant des troubles de mémoire induits par le vieillissement (Sapolsky et al., 1986, Pardon and Rattray, 2008, Tronche et al., 2010) et serait également impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Campbell et al., 2014). Une hypoactivité est également observée dans la fibromyalgie et le syndrome de fatigue chronique (McEwen, 2007, Chrousos and Kino, 2009).

4. Dysfonctionnement de l'axe corticotrope : la dépression

Lors d'une réponse adaptative et dans le cas d'un stress aigu, l'organisme s'adapte et rétablit son équilibre homéostatique. Cependant, un stress chronique peut avoir des conséquences néfastes, aux niveaux physique, mental et émotionnel. Dans ce contexte, la récupération et le retour de l'organisme à une homéostasie basale deviennent difficiles et des réponses inappropriées se développent. Cette inadaptation au stress conduit au développement de nombreuses maladies, notamment de la dépression (Piazza and Le Moal, 1998, Koob and Le Moal, 2001, Chrousos, 2009).

Le trouble associé à une perturbation de l'axe corticotrope le plus commun est la **dépression**. Une personne sur six souffrira au cours de sa vie de cette pathologie (Kessler et al., 2003, Kessler et al., 2005). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), **le nombre de personnes atteintes de ce trouble de l'humeur dans le monde est estimé à plus de 350 millions**. La dépression se caractérise par la présence pendant au moins deux semaines, d'au minimum cinq des symptômes suivants : humeur triste, anhédonie, sentiment de culpabilité, idées suicidaires, asthénie et trouble du sommeil, selon le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders – DSM IV). Associée aux troubles affectifs, la dépression s'accompagne également de désordres cognitifs entraînant des problèmes d'attention, d'interprétation et de mémoire (Burt et al., 1995, Mathews and MacLeod, 2005, Gotlib and Joormann, 2010). Des perturbations majeures de la mémoire (Goodwin, 1997), en particulier de la mémoire à court terme (Pelosi et al., 2000, Harvey et al., 2004) et de la mémoire explicite ont également été identifiées (Austin et al., 1999).

La dépression est une maladie multifactorielle dont l'étiologie n'est que partiellement élucidée. En effet, il existe de nombreux facteurs génétiques et environnementaux qui favorisent l'émergence de la dépression. Les facteurs génétiques notamment semblent importants puisque l'héritabilité serait d'environ 40% (Sullivan et al., 2000b), ce qui a suscité plusieurs travaux visant à identifier les gènes susceptibles d'être impliqués dans la transmission de la dépression. On a pu identifier notamment le gène codant pour le transporteur de la sérotonine (SERT) comme élément clé de ce mécanisme. En effet, la présence d'allèle court au niveau de la région promotrice du SERT induirait une réduction de l'activité de son expression et une baisse de la recapture de la sérotonine (Lesch et al., 1996). La variante courte de la région promotrice du SERT serait associée à l'émergence de troubles dépressifs chez l'homme et prédisposerait aux comportements anxieux (Lesch et al., 1996, Ogilvie et al., 1996, Caspi et al., 2003). Malgré des résultats contradictoires (Kunugi et al., 1996, Hoehe et al., 1998), l'hypothèse monoaminergique a été confortée par la découverte de deux familles de composés ayant des effets antidépresseurs chez l'homme. Ces composés sont des inhibiteurs de la monoamine oxydase (MAO) et des antidépresseurs tricycliques (ATC), qui permettent d'augmenter la biodisponibilité des monoamines (noradrénaline, dopamine et sérotonine). De plus, des données

obtenues chez des patients déprimés montrent une réduction de l'activité des systèmes sérotoninergique et noradrénergique (Owens and Nemeroff, 1994, Lambert et al., 2000).

Si l'implication de la sérotonine et de la noradrénaline dans la dépression est avérée, une déficience dopaminergique semble également intervenir. En effet, les agonistes partiels des récepteurs dopaminergiques D2, comme le bupropion ou le pramipexole, développés pour le traitement de la maladie de Parkinson, sont efficaces dans le traitement de la dépression (Cassano et al., 2004, Gershon et al., 2007). D'autres hypothèses et notamment celle des facteurs neurotrophiques suggèrent qu'une diminution du Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pourrait être une des bases biologiques de la dépression (Duman and Monteggia, 2006, Heldt et al., 2007). En effet, le BDNF qui favorise la croissance axonale, la survie neuronale et la plasticité synaptique (Kang and Schuman, 1995, Figurov et al., 1996, Pozzo-Miller et al., 1999) a une expression réduite chez des patients déprimés (Karege et al., 2005). La diminution du BDNF pourrait ainsi être responsable des altérations induites par le stress au sein de l'HPC, telles que les perturbations de la plasticité synaptique, la diminution de la neurogenèse et l'atrophie neuronale. Ces altérations pourraient participer à la diminution du volume de l'HPC et à l'émergence des troubles cognitifs observés chez les patients déprimés (Pittenger and Duman, 2008). Dans ce sens, une autre étude a montré que l'augmentation du taux de BDNF dans l'HPC facilite la neurogenèse et améliore certains symptômes cognitifs associés à la dépression (Airan et al., 2007).

Si de nombreux facteurs de risque sont associés à la dépression, le stress et la régulation du stress par l'axe corticotrope semblent particulièrement impliqués dans l'émergence de la dépression. Le stress chronique est notamment un facteur étiologique important de la dépression, même s'il n'est ni nécessaire ni suffisant (Nestler et al., 2002). Ainsi la chronicité d'un stress induit une réduction du tonus inhibiteur de l'hypothalamus entraînant l'hyperactivité de l'axe corticotrope (Parker et al., 2003), une perturbation neurophysiologique qui accompagne la dépression. En effet, les patients déprimés présentent une élévation du taux de cortisol plasmatique (Parker et al., 2003, Raison and Miller, 2003, Burke et al., 2005) ou de CRH dans le liquide céphalorachidien (Raison and Miller, 2003, Merali et al., 2004). Des études ont démontré que certains symptômes pseudo-dépressifs pouvaient être induits chez le rat par l'administration chronique de GCs (Gourley et al., 2008). **La suractivation de l'axe corticotrope ne correspond donc pas à un simple épiphénomène mais jouerait un rôle essentiel dans la pathogenèse de la dépression.**

L'altération du rétrocontrôle de l'axe corticotrope est notamment observée chez les patients dépressifs, entraînant une libération importante de CRH ainsi que l'augmentation de son expression et de son immunoréactivité dans le PVN de l'hypothalamus. Il a été montré qu'une surexpression du CRH est associée au comportement de type dépressif chez la souris (Lu et al., 2008). L'hyperactivité de l'axe corticotrope et l'augmentation du taux basal de GCs pourraient à long terme induire une diminution du fonctionnement des récepteurs aux GCs provoquant une "résistance aux GCs" responsable du déficit du rétrocontrôle négatif.

Il a été démontré que l'hypercortisolémie a un effet excitotoxique entraînant une diminution du nombre de dendrites, une réduction de la spinogénèse ainsi que l'apoptose des neurones et la diminution de la neurogenèse chez l'animal adulte (Woolley et al., 1990, McEwen, 2007). Chez les sujets dépressifs, la réduction de la taille des neurones, du nombre de cellules gliales et de la taille des dendrites dans le CPF et l'HPC a été constatée dans des études post-mortem (Ongur et al., 1998, Bowley et al., 2002, Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Des diminutions du volume de l'HPC et des cortex cingulaire antérieur et préfrontal ont également été largement rapportées par des études en imagerie par résonance magnétique (Sheline, 2003, Drevets et al., 2008). La diminution du volume du lobe frontal est également une altération souvent retrouvée chez les patients dépressifs (Krishnan et al., 1992, Coffey et al., 1993, Lai et al., 2000). Dans certains modèles animaux de la dépression, une diminution du volume de l'HPC a été observée (1) chez des musaraignes exposées à un stress social chronique, causé par un conflit de subordination (Czeh et al., 2001), (2) chez des rats soumis à un stress chronique (Magarinos et al., 1996, Lee et al., 2009), (3) chez des souris immobilisées 6 heures par jour, durant 4 semaines (Yun et al., 2010) ou encore chez des rats soumis à des injections de GCs répétées (Woolley et al., 1990). Ces résultats ont été confirmés par des observations récentes en microscopie électronique montrant une rétractation des épines dendritiques, associée à une diminution de leur volume dans l'aire CA3 de l'HPC, chez des rats ayant subi un stress de contention (Stewart et al., 2005). Des changements morphologiques des terminaisons des fibres myélinisées et une perte significative de synapses ont également été identifiés chez des rats soumis à un stress chronique (Sousa et al., 2000).

De plus, les études d'imagerie fonctionnelle ont permis d'apporter des informations sur la dynamique cérébrale en termes d'activation et d'inhibition régionale. Ces techniques ont rapporté une baisse du métabolisme du glucose et du flux sanguin se traduisant par une diminution de l'activité métabolique au sein des régions limbiques dorsales (cortex cingulaire antérieur et postérieur, striatum) et néocorticales (cortex frontal, préfrontal, prémoteur et pariétal) chez les patients déprimés (Baxter et al., 1985, Drevets et al., 2008, Savitz and Drevets, 2009). Les hypoactivités des régions dorsales des cortex cingulaire et frontal peuvent être associées à des altérations des performances cognitives.

2. Modèle de stress chronique léger imprédictible.

Des modèles de stress aigu et chronique ont été développés afin de caractériser l'étiologie et la pathophysiologie de la dépression et afin de mettre au point de nouveaux traitements. Des modèles de stress aigu tels que le test de la nage forcée ou le test de suspension par la queue ont été utilisés pour tester les traitements efficaces en clinique. Si ces modèles sont efficaces lors de tests de criblage en pharmacologie, ils demeurent insuffisants pour l'étude de la pathophysiologie de la dépression et des mécanismes d'action des traitements. Des modèles de dépression chronique ont ainsi été développés afin d'induire un état anormal maintenu pendant une période prolongée. Durant cette période, une

« thérapie » peut alors être administrée et fournir un outil pour comprendre le mécanisme d'action des traitements. Actuellement, il existe 6 modèles: des modèles basés sur des manipulations génétiques, les modèles de séparation maternelle des rongeurs, l'administration chronique d'hormones du stress, le test du désespoir acquis, le protocole de défaite sociale et le protocole du stress chronique léger imprédictible (SCLI). Les modèles du désespoir acquis et du stress social sont des stress physiques peu compatibles avec des exigences éthiques actuelles. En effet, le modèle du désespoir acquis consiste à appliquer 40 chocs électriques plantaires, d'une manière incontrôlable alors que le stress social consiste à exposer tous les jours, pendant 15 jours, des souris à un congénère agressif induisant de nombreuses blessures. Le protocole de séparation maternelle, extrêmement psychogène pour les rongeurs, imite peu la situation clinique. Enfin, les manipulations génétiques et l'injection de corticostérone sont basées sur une causalité biologique univoque, ce qui ne correspond pas aux données obtenues chez l'homme. Ainsi, le meilleur compromis semble être une version particulière de stress chronique, le stress chronique léger imprédictible (SCLI). Ce protocole initialement développé par Willner (1987) permet une conservation phylogénétique de la signature moléculaire de la dépression humaine (Sibille et al., 2009). Le SCLI consiste en l'exposition chronique de rongeurs à divers stressseurs socio-environnementaux d'intensité faible selon une séquence imprédictible afin d'éviter tout phénomène d'habituation. Ainsi, l'efficacité du modèle dépend plus de la chronicité et de la variabilité des stressseurs que de leurs caractéristiques individuelles. De plus, pour des raisons éthiques, les stress nociceptifs ainsi que les privations d'eau et de nourriture ont été supprimés.

Les nombreux travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui montrent que ce modèle est vraisemblablement l'un des plus pertinents pour étudier la physiopathologie des troubles dépressifs, car il repose sur l'utilisation de facteurs étiologiques de la dépression. Cette caractéristique lui confère une bonne validité de construction. Le SCLI permet également de reproduire de nombreuses altérations, analogues aux symptômes induits par la dépression chez l'homme. En effet, le SCLI induit des altérations physiques, comportementales et cognitives : anhédonie, anxiété, modifications des interactions sociales, réduction de la prise de poids, diminution de la motivation à réaliser des activités autocentrées. La procédure de SCLI reproduit également des altérations endocriniennes majeures telles que des perturbations des taux de GCs et des déficits de rétrocontrôle de l'axe corticotrope (Detanico et al., 2009, Palumbo et al., 2010, Surget et al., 2011). D'autres types d'altérations observées chez les dépressifs sont également retrouvées, tels que des modifications des taux de monoamines dans plusieurs régions cérébrales (Vancassel et al., 2008, Yalcin et al., 2008), une diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse hippocampique (Mineur et al., 2007, Surget et al., 2008, Surget et al., 2011). Un des arguments les plus pertinents quant à la validité de ce modèle a été obtenu grâce à une étude de comparaison entre les changements transcriptionnels induits par le SCLI chez la souris et ceux se produisant lors d'un épisode dépressif chez l'Homme, dans le cortex cingulaire et dans l'amygdale (Sibille et al., 2009). Cette étude a montré l'existence d'une conservation

phylogénétique de la signature moléculaire (corrélation des gènes affectés) entre la dépression humaine et celle existant après le SCLI chez la souris.

Ce modèle présente en outre une grande validité prédictive, puisque les altérations physiques, comportementales, neurobiologiques et neuroendocriniennes induites par le SCLI peuvent être réduites par différentes classes d'antidépresseurs, incluant les tricycliques et les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Yalcin 2008, isingrini 2010, Ibraquen-Vargas 2008).

Deuxième partie :

La mémoire

A. Théories de la mémoire

1. Généralités

L'une des principales fonctions cognitives est la mémoire ; elle permet d'acquérir, de stocker et de rappeler des expériences passées et des informations. La mémoire est classiquement organisée en phases, temporellement distinctes :

- l'**apprentissage** (ou encodage) correspond à l'acquisition des informations, et varie selon le niveau attentionnel ou émotionnel du sujet (Aston-Jones, 2005).
- la **consolidation** mnésique permet le stockage des informations au cours du temps. Cette phase entraîne le passage d'une forme « labile » à une forme « stable » de la mémoire. Cette forme stable correspond à l'ensemble des modifications neuronales induites par l'apprentissage (Nakazawa et al., 2004).
- le **rappel** mnésique est la phase de « récupération » du souvenir où l'information passe de l'état inactif à l'état actif. La récupération de l'information induit un processus de reconsolidation de l'information évoquée qui s'accompagne d'un retour à l'état « labile », pouvant engendrer la modification voire l'oubli de l'information initiale (Nader and Hardt, 2009).

L'observation de patients avec des syndromes amnésiques et les données de l'expérimentation animale ainsi que les progrès en matière d'imagerie cérébrale permettent actuellement de mieux comprendre les différents systèmes de mémoire.

2. Mise en évidence des systèmes de mémoire ; le cas du patient H.M.

Les scientifiques ont tiré une grande partie de leurs connaissances actuelles sur la mémoire de l'observation de patients présentant des déficits cognitifs spécifiques liés à une lésion cérébrale relativement bien localisée. Le patient le plus célèbre est sans conteste H.M.; (Henry Gustav Molaison 1926–2008), qui fut étudié pendant 40 ans à Montréal par le Docteur Brenda Milner.

A la suite d'un accident de vélo à neuf ans, H.M. commença à souffrir de violentes crises d'épilepsie résistantes aux traitements. Son neurochirurgien (William Scoville), après avoir localisé le foyer épileptogène dans les lobes temporo-médians droit et gauche, pratiqua la résection bilatérale des deux zones comprenant l'HPC, l'amygdale et le gyrus parahippocampique (**Fig. 10**). L'ablation réduisit le nombre de crise d'épilepsie mais eut pour effet secondaire d'engendrer un syndrome d'amnésie antérograde sévère, accompagné d'une amnésie rétrograde plus légère (gradient d'environ 11 années).

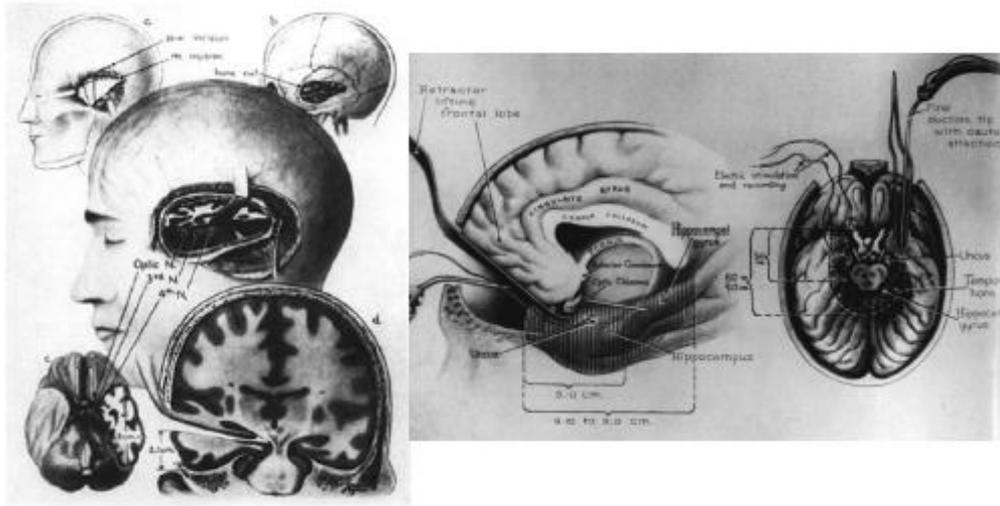


Figure 10 : illustration de la résection du lobe temporo-médian effectuée par Scoville sur le patient H.M.

Brenda Milner démontra par la suite, que H.M. pouvait garder à l'esprit et manipuler des informations pendant plusieurs minutes mais à la moindre distraction, il oubliait même qu'il devait se souvenir de quelque chose (Scoville and Milner, 1957). Dès lors, les scientifiques confirmèrent qu'il existait plusieurs formes de mémoire; à long terme et court terme. Ils avaient désormais la preuve que ces deux processus se produisaient dans des zones bien distinctes du cerveau. De plus, d'autres études montrèrent que les capacités perceptives et intellectuelles, ainsi que la mémoire procédurale implicite, étaient épargnées, ce qui permit au patient H.M. d'apprendre de nouveaux gestes sans même se souvenir de les avoir déjà effectués (Gabrieli, 1993, Corkin, 2002). L'étude de ce patient par Brenda Milner permit de conclure d'une part que l'HPC, bien qu'indispensable à la formation et à la consolidation de nouveaux souvenirs, n'intervient plus dans le rappel de souvenirs très anciens, et qu'il existe d'autre part plusieurs systèmes de mémoire qui ne reposent pas sur l'intégrité des mêmes structures anatomiques. Dès lors, il est apparu indispensable de classifier ces systèmes et de comprendre leur fonctionnement dans une perspective d'interactivité.

B. Les systèmes de mémoire

1. Modèle modal d'Atkinson et Shiffrin

Sur la base de travaux antérieurs, ces auteurs organisent la mémoire en trois modules de traitement, fonctionnant en série (**Fig. 11**). Dans un premier temps, l'organisme traite les informations émanant du monde extérieur grâce aux différents **registres sensoriels** pendant un délai très bref (quelques millisecondes). Ces registres fournissent des informations à la seconde composante du modèle, la **mémoire à court terme** (MCT) dont la capacité est limitée et le stockage bref. L'information maintenue en MCT peut alors être transférée en **mémoire à long terme** (MLT) qui en théorie, permet un stockage illimité en quantité et durée. Bien que permettant d'appréhender aisément les phases nécessaires à la mise en mémoire d'une information, Shallice et Warrington (1970) démontrent les limites de ce modèle en rapportant que certains patients présentent une perturbation de la MCT tout en conservant une MLT et des capacités d'apprentissages préservées.

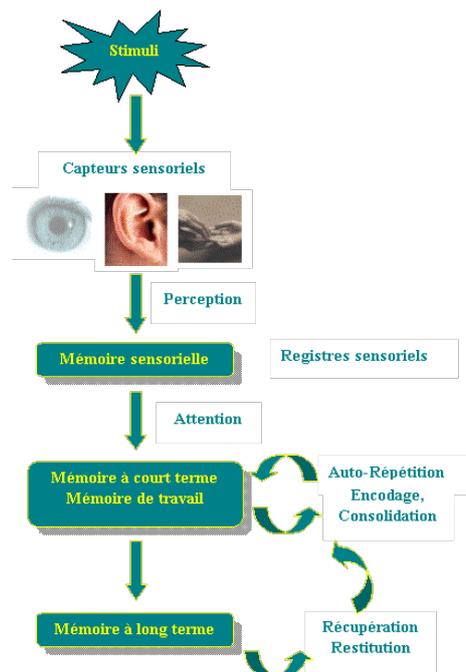


Figure 11 : illustration du modèle modal de la mémoire d'après Atkinson et Shiffrin (1968). Ce modèle repose sur l'existence d'un continuum entre la perception et la mémoire à long terme.

2. Modèle de la mémoire à long terme

a. Modèle dichotomique de Squire

Sur la base de travaux cliniques et de données de l'expérimentation animale, Larry Squire propose un modèle de classification de la mémoire (**Fig. 12**), encore utilisé actuellement même s'il ne fait pas l'unanimité (Squire, 1992). Dans ce modèle, chaque système mnésique est considéré de façon individuelle, comme une entité psychologique et biologique isolée. Dans cette schématisation de la mémoire, deux grands systèmes sont en opposition : la mémoire déclarative et la mémoire non déclarative (Squire, 2004).

La mémoire **déclarative (ou explicite)**, est définie comme un système de mémoire flexible chargé du rappel conscient de différents faits et événements dont le contenu «peut être déclaré ». Elle dépend de l'intégrité du lobe temporal médian et regroupe la mémoire sémantique (connaissances factuelles du monde), la mémoire épisodique (autobiographique) et intègre un contexte spatio-temporel.

La mémoire **non-déclarative (ou implicite)** résulte de l'expérience et s'exprime au travers de l'action, elle ne constitue pas une seule forme de mémoire et n'est pas sous-tendue par un seul système. Elle inclue l'information acquise lors de l'apprentissage d'habiletés (motrices, perceptives, cognitives), les phénomènes d'amorçage, le conditionnement classique et l'apprentissage non-associatif.

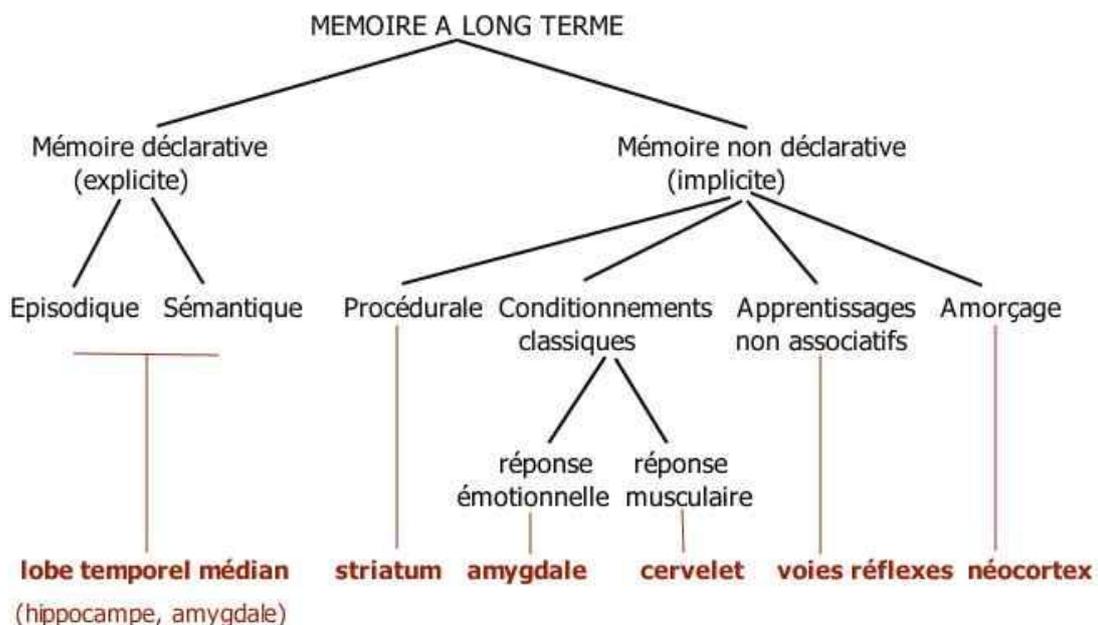


Figure 12 : schéma d'après la classification dichotomique, proposée par Squire (2004).

Il regroupe l'ensemble des capacités mnésiques d'un sujet humain et les structures cérébrales impliquées dans l'encodage de l'information.

Cependant, ce modèle présente des limites puisqu'il est maintenant reconnu qu'il existe des relations dynamiques d'indépendance, de synergie, de compétition ou de potentialisation entre ces différentes formes de mémoire qui n'apparaissent pas dans ce modèle. De plus, les mémoires sémantiques et épisodiques apparaissent liées sur le plan systémique et fonctionnel alors que certaines données montrent que des informations sémantiques peuvent être acquises sans intervention de la mémoire épisodique (Vargha-Khadem et al., 1997).

b. Modèle de Tulving

Contrairement à Squire, Tulving estime que les mémoires sémantique et épisodique ne peuvent être regroupées au sein d'un même système déclaratif unitaire. Tulving décrit le cas d'un patient souffrant d'une lésion du lobe temporal médian présentant une amnésie rétrograde asymétrique plus marquée pour les souvenirs épisodiques que sémantiques (Tulving et al., 1988).

Il élabore donc un modèle capable d'expliquer cette asymétrie et distingue cinq systèmes de mémoire (**Fig. 13**):

- La **mémoire procédurale** : elle constitue le plus ancien et le plus important système de mémoire
- Le **système de représentation perceptive** : il contient des ébauches perceptives des éléments constitutifs de la mémoire sémantique
- La **mémoire sémantique** : elle serait sous-tendue par les régions parahippocampiques et l'HPC
- La **mémoire primaire** : elle correspond à la mémoire de travail (MDT)
- La **mémoire épisodique** : elle dépend de l'HPC

Ce dernier système est dit auto-noétique parce qu'il implique une prise de conscience de l'objet et du sujet. Il est opposé aux systèmes anoétiques (mémoire procédurale et perceptive) ne nécessitant pas de prise de conscience de l'objet.

Tulving décrit également des interactions entre les systèmes et définit ces interactions sous le nom de modèle « Sériel, Parallèle et Indépendant (SPI) ». L'encodage s'effectue de façon **sérielle** dans un système après l'autre et en **parallèle** puisque les éléments peuvent être stockés dans plusieurs systèmes en même temps. En revanche, la récupération se fait de manière **indépendante**, dans le système concerné. Ainsi la mémoire sémantique est encodée avant la mémoire épisodique, mais les informations sont stockées en parallèle. Le rappel peut donc se faire indépendamment, y compris en cas de lésions structurelles touchant l'une des mémoires.

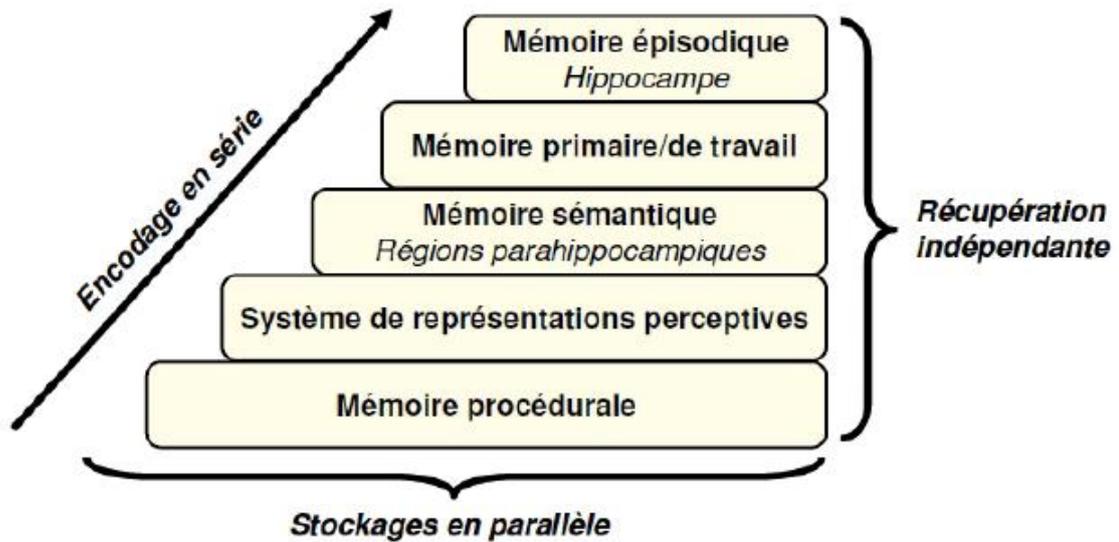


Figure 13 : modèle théorique SPI, de l'organisation des systèmes de mémoire, selon Tulving (1995).

Malgré le fait que de nombreuses théories sur la mémoire soutiennent l'idée d'une dichotomie entre les systèmes, des théories comme par exemple, la théorie « MPMS » (Multiple Parallel Memory Systems) et l'analyse détaillée des connexions anatomiques suggèrent l'existence d'interactions entre les systèmes de mémoire. En effet, des connexions directes ou indirectes existent au sein des différents réseaux. Par exemple, l'amygdale projette sur l'HPC et le striatum, et le striatum projette sur l'HPC et l'amygdale, de manière réciproque. De plus, le CPF, une structure de plus haut niveau, reçoit également des projections réciproques de ces systèmes de mémoire confortant l'idée d'interactions coopératives et/ou compétitives entre les réseaux.

C. La mémoire de travail

1. Les modèles

Le sujet de cette thèse étant de déterminer le rôle des GCs durant le sevrage à l'alcool dans l'émergence d'altérations cognitives et notamment des troubles de la mémoire de travail (MDT), nous décrirons plus spécifiquement cette mémoire.

La MDT est la capacité de garder temporairement une information, de la contrôler et de la manipuler dans un but particulier. Par conséquent, elle nécessite de maintenir des informations obtenues dans le passé, en fonction des exigences immédiates, afin de planifier ses actions dans un objectif futur. Lorsque l'information n'est plus utile, il est nécessaire de l'oublier ou de l'effacer afin de minimiser les conflits entre les informations non pertinentes et pertinentes lors des décisions ultérieures (Dudchenko, 2004).

La MDT permet également l'intégration de différentes informations pour la planification, la prise de décision et la résolution de problème. Par exemple, quand un problème se présente on doit réaliser une série d'évaluations comparatives afin de déterminer les avantages et les inconvénients de chaque solution potentielle. Ces opérations nécessitent le stockage transitoire et la manipulation ultérieure des informations pertinentes afin d'obtenir le but désiré. En outre, la MDT repose sur plusieurs autres opérations cognitives dont l'attention, la sélection, la mise à jour et la flexibilité cognitive. La MDT permet la manipulation des nouvelles informations afin de s'assurer que l'objectif est atteint.

a. Modèle de Baddeley

Baddeley et Hitch, en 1974, présentent la première modélisation de la MDT ; de nos jours, cette proposition reste encore la plus influente. Ce système apparaît comme une interface permettant la rétention temporaire d'un nombre limité d'information et leur manipulation en vue de l'exécution de tâches cognitives, ou de leur stockage en MLT.

Le modèle de la MDT (**Fig. 14**) met en jeu un centre exécutif responsable des processus de contrôle attentionnel (Baddeley, 2010). Ce **centre exécutif, encore appelé administrateur central**, supervise deux systèmes asservis en sélectionnant les stratégies cognitives utiles et en assurant la coordination des informations provenant de différentes sources. Ce centre exécutif semble fortement requérir l'activité des lobes frontaux.

Les deux systèmes asservis sont **la boucle phonologique et le calepin visuo-spatial**.

- La boucle phonologique manipule les informations verbales ou auditives dans un stock phonologique. Un processus de répétition verbale permettrait de rafraîchir les informations ainsi que le transfert d'informations visuelles vers le stock phonologique par un mécanisme de réencodage phonologique.

- Le calepin visuo-spatial permet de maintenir un nombre limité d'informations spatiales pouvant être fractionnées en une composante visuelle et une composante spatio-motrice. Son rôle est de générer et de manipuler des images mentales.

En revanche, cette première version du modèle de Baddeley ne permettait pas d'expliquer les relations entre la MDT et la MLT, notamment la capacité de manipuler des connaissances anciennes dans la réalisation d'une tâche de MDT. Ainsi un 4^{ème} élément, le **tampon épisodique** a été introduit (Baddeley, 2000). Ce sous-système de capacité limitée, est un système de stockage temporaire qui maintient disponible les informations nécessaires à la réalisation d'une tâche. Sous le contrôle de l'administrateur central via les processus attentionnels, il permet la manipulation du contenu intégré et constitue une interface entre la MDT et la MLT (Quinette et al., 2006, Eustache and Desgranges, 2008).

Des études d'IRM fonctionnelle couplée à des tests mnésiques chez des sujets sains et des patients présentant des lésions frontales (Goldman-Rakic, 1995, D'Esposito et al., 1999a, D'Esposito et al., 1999b) ont révélé l'implication du CPF dans l'accomplissement des tâches de MDT. De plus, l'ablation et/ou la lésion neurotoxique du CPF dorsolatéral chez le primate ont démontré son implication spécifique dans la MDT (Owen, 1998). Ceci a été corroboré par des approches électrophysiologiques consistant à effectuer des enregistrements cellulaires du CPF médian chez les rongeurs dans des épreuves de réponse retardée mais aussi dans des tâches de mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y, labyrinthe radial à huit bras). Combinés à des lésions spécifiques, les tests comportementaux ont révélé l'implication du CPF médian dans la MDT (Dudchenko, 2004, Chudasama, 2011), et plus précisément du cortex prélimbique chez les rongeurs (Delatour and Gisquet-Verrier, 1996, 1999). Le rôle de l'HPC dans la MDT a également été précisé notamment par le groupe de David Olton (1979), dans une épreuve de discrimination spatiale réalisée dans un labyrinthe radiaire chez la souris et le rat. Dans ce test, le rongeur doit visiter les différents bras d'un labyrinthe afin d'y trouver une récompense alimentaire. Il doit visiter les bras d'un labyrinthe appâté et apprendre qu'il est inutile de retourner dans un bras déjà visité, puisque la récompense a déjà été consommée. Ce test de MDT ne nécessite pas de consolidation de la trace mnésique mais pourtant l'intégrité de l'HPC est importante pour réussir cette épreuve (Olton and Papas, 1979).

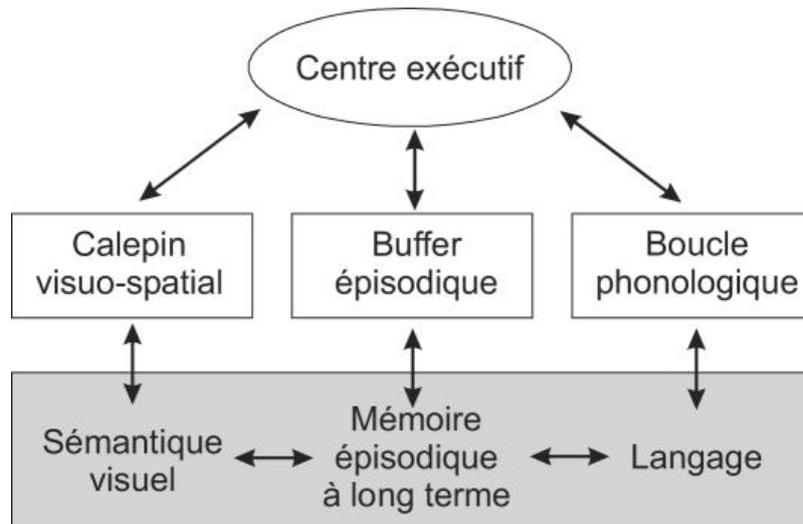


Figure 14 : modèle de la mémoire de travail, selon Baddeley (2000).

L'administrateur central contrôle les deux sous-systèmes et communique avec la mémoire à long terme par le tampon épisodique.

b. Modèle de Cowan

Si le modèle de Baddeley reste le plus cité dans les travaux sur la MDT, des concepts alternatifs sont envisagés tels que le modèle de Cowan (1988). Ce modèle est unitaire et il n'existe pas de systèmes séparés traitant les différents types de données (verbales *vs.* visuelles), ni même de distinction réelle entre la MDT et la MLT. Ce modèle est centré sur l'attention : les informations seraient plus ou moins activées en mémoire selon le niveau attentionnel du sujet. Ainsi la MDT serait un état particulier de la MLT.

2. Aspect neurofonctionnel

a. Le cortex préfrontal

Le CPF est une zone du cortex cérébral située à l'avant du lobe frontal. Le CPF est impliqué dans de nombreux processus cognitifs, exécutifs ou émotionnels. Le CPF peut être subdivisé en plusieurs zones incluant, le cortex orbitofrontal, le cortex dorsolatéral, le cortex cingulaire et l'aire de coordination oculomotrice chez le primate. Ces sous-région trouvent leurs équivalent fonctionnel chez le rongeurs; il est par exemple établi que le CPF dorsolatéral du primate correspond au cortex prélimbique des rongeurs (**Tableau 1**) (Heidbreder and Groenewegen, 2003, Uylings et al., 2003, Vertes and Hoover, 2008).

RONGEUR		PRIMATE	Référence
CPF médian ventral	Prélimbique	CPF dorsolatéral CPF ventromédian	Vertes, 2004 ; Seamans et al., 2008
	Infralimbique	Cortex cingulaire antérieur CPF orbitomédian	
Cortex orbitofrontal		Cortex orbitofrontal	Schoenbaum et al., 2003
CPF médian dorsal		Aire de coordination oculomotrice	Seamans et al., 2008

Tableau 1 : homologies régionales du CPF entre primate et rongeur

Chez les rongeurs le CPF (**Fig. 15**) est subdivisé en trois régions (Dalley et al., 2004):

- le CPF **médian**, subdivisé en une zone dorsale et une zone ventrale (comprenant le cortex prélimbique, infralimbique et orbital médian)
- le CPF **latéral** subdivisé en cortex orbitolatéral, cortex insulaire ventral et dorsal
- le CPF **ventral** comprenant des aires du cortex orbitofrontal

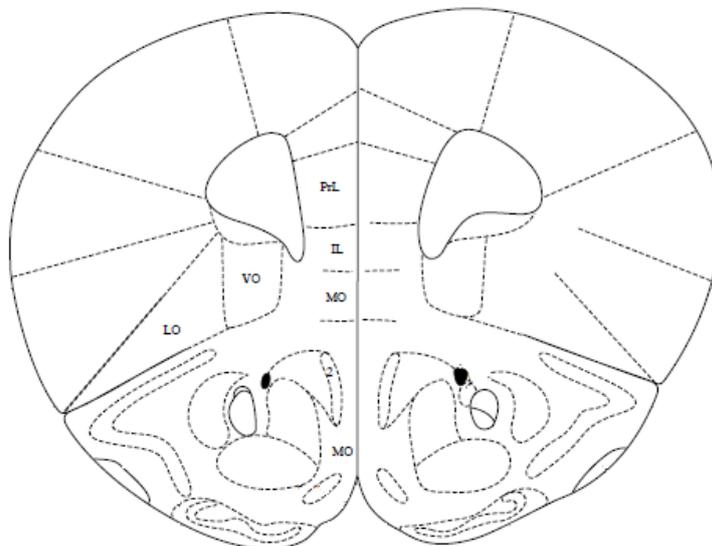


Figure 15 : organisation du cortex préfrontal chez le rongeur.

PrL : prélimbique, IL : infralimbique, LO : orbito latéral, MO : orbito médian, VO : orbito ventral.

Le CPF est formé de six couches distinctes composées à 80% de neurones pyramidaux, excitateurs glutamatergiques. Les 20% restant correspondent à des interneurons inhibiteurs ou excitateurs, des cellules fusiformes excitatrices et des cellules gliales (Markram et al., 2004, Silberberg et al., 2005).

De part ses importantes connexions directes ou indirectes avec les autres régions corticales et sous-corticales, le CPF a un rôle d'intégrateur central au sein du système nerveux (**Fig. 16**). D'importantes connexions réciproques existent notamment avec les régions sous-corticales du système

limbique ainsi qu'avec de nombreuses aires corticales sensorielles associatives (somatiques, auditives et visuelles) (Fuster, 2001).

Afférences : il reçoit des afférences des noyaux du thalamus et des ganglions de la base (striatum et pallidum), ainsi que de l'amygdale et de l'HPC. En particulier, la région CA1 de l'HPC et le subiculum projettent massivement vers la partie ventrale du CPF médian (Laroche et al., 2000, Heidbreder and Groenewegen, 2003). D'autres structures sous-corticales comme la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, l'hypothalamus latéral ou des noyaux du tronc cérébral comme le noyau du raphé innervent également le CPF.

Efférences : le CPF projette sur le thalamus, les ganglions de la base et les structures corticales/sous-corticales. Plus précisément, le cortex infralimbique projette vers le tronc cérébral et les aires de contrôle viscéro-moteur, l'hypothalamus et l'amygdale. La région prélimbique projette majoritairement vers le système limbique: le noyau accumbens, l'amygdale, le thalamus, ou encore l'hypothalamus (Chiba et al., 2001, Vertes, 2004, Gabbott et al., 2005).

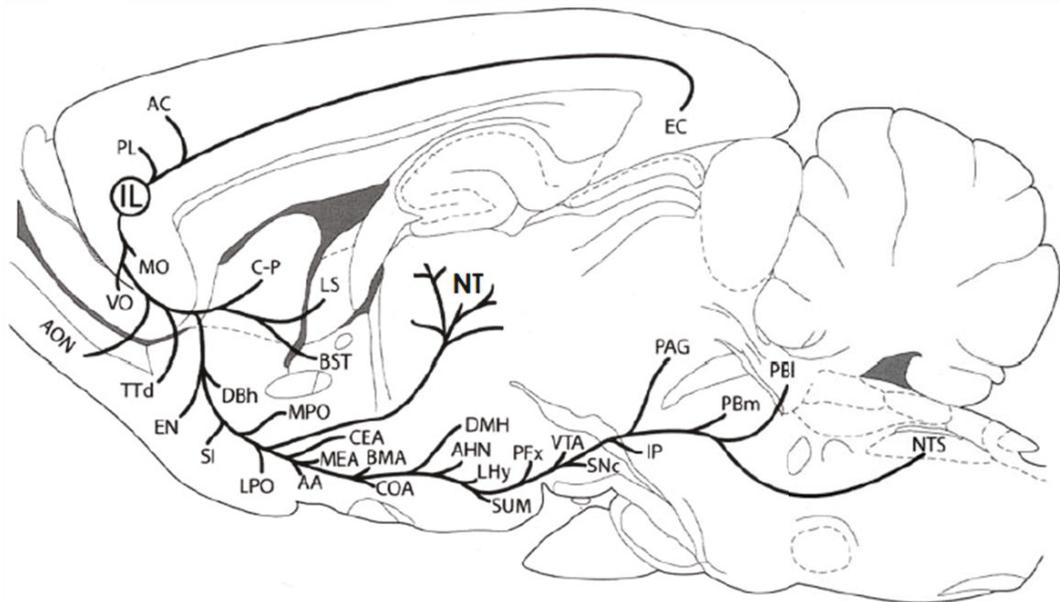
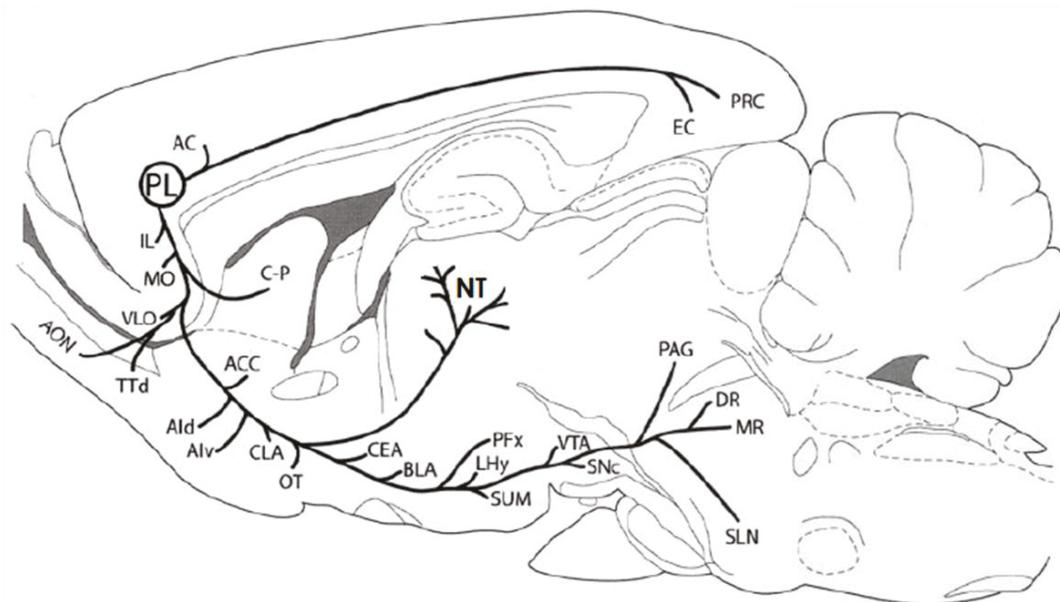
A**B**

Figure 16 : principales projections des cortex infralimbique (A) et prélimbique (B).

AA: aire antérieure de l'amygdale, AC : cortex antérieur cingulaire, ACC : noyau accumbens, AHN: noyau antérieur de l'hypothalamus, AI/d/v: cortex insulaire agranulaire/dorsal/ventral, AON: noyau antérieur olfactif, BMA: noyau basomédian de l'amygdale, BLA : noyau basolatéral de l'amygdale, C: cerebellum, CEA : noyau central de l'amygdale, CLA: claustrum, COA: noyau cortical de l'amygdale, C-P: caudé/putamen ; DBh: noyau de la bande diagonale, bord horizontal, DR: noyau dorsal du raphé, EN: noyau endopiriforme, EC : cortex entorhinal, IC: colliculus inférieur, IP: noyau interpédonculé, IL : infralimbique, LHy: aire hypothalamique latérale, LPO: aire latérale préoptique, LS: noyau du septum latéral, MEA: noyau médian de l'amygdale, MO: cortex orbitomédian, MPO: aire preoptique médiane, MR: noyau du raphé médian, N7: noyau facial, NT: noyaux thalamiques, NST : noyau du tractus solitaire, OT: tubercules olfactifs, PBm/l: noyau parabrachial médian/lateral, PFx: région perifornicale de l'hypothalamus, PL : prélimbique, PN: noyau du pons, PRC: cortex périrhinal, SI: substance innominée, SLN: noyau supralemniscal (B9), SNc : substance noire compacta, SUM: noyaux supramamillaires, TTd: taenia tecta partie dorsale, VLO: cortex orbital ventro-latéral, VO: cortex orbital ventral, VTA : aire tégmentale ventrale (adapté de Vertes, 2004).

Compte tenu des projections afférentes et efférentes, le CPF médian ventral est idéalement placé pour jouer un rôle important dans les fonctions cognitives et émotionnelles.

De fait, le CPF est impliqué dans le contrôle exécutif (planification, raisonnement abstrait, inhibition d'une action), la mémoire ou encore les émotions. En général, il intervient pour diriger le flux d'informations relatives aux inputs, aux états internes et aux outputs (Delatour and Gisquet-Verrier, 2000, Miller, 2000, Miller and Cohen, 2001). Ces fonctions sont, dans une certaine mesure, restreintes à des sous-régions spécifiques (Duncan and Owen, 2000). Par exemple, le CPF dorso-latéral et son équivalent chez le rongeur, le CPF dorso-médian, sont considérés comme étant les «régions exécutives» car ils intègrent les informations sensorielles pour aider la coordination de la planification motrice ou les processus attentionnels (Heidbreder and Groenewegen, 2003, Dalley et al., 2004, Tanji and Hoshi, 2008). Ils se distinguent des « régions limbiques » liées à des aspects cognitifs, émotionnels et mnésiques de part ses interactions étroites avec le système limbique. Ces régions orchestrent conjointement le comportement approprié au contexte et au résultat espéré. Cette spécialisation fonctionnelle régionale au sein du CPF a été mise en évidence, d'une part, grâce à des lésions spécifiques sur des modèles animaux (rat, singe) ou des manipulations pharmacologiques visant à détruire ou inhiber une structure, d'autre part, chez des patients présentant des lésions sélectives des sous-régions du CPF.

b. L'hippocampe

L'HPC est une structure cérébrale appartenant au système limbique, son rôle est largement étudié depuis les années 1950 notamment depuis les travaux pionniers avec le patient H.M. (précédemment décrit). L'HPC est une structure phylogénétiquement ancienne (archicortex) comportant trois couches cellulaires en forme de C en vue sagittale, qui se développe sur un axe septo-temporal, aussi appelé axe dorso-ventral (Amaral & Witter, 1995). En coupe frontale, l'HPC présente deux structures en forme de « U » inversé composé du gyrus denté et de la corne d'Ammon, laquelle est subdivisée en trois champs : les champs CA1, CA2 et CA3 (**Fig. 17**). Bien que la corne d'Ammon constitue l'HPC, la formation hippocampique se compose de l'HPC (CA1-CA2-CA3 et GD) et des structures para-hippocampiques d'entrée (le cortex entorhinal) et de sortie (le subiculum). Deux types cellulaires principaux existent au sein de la formation hippocampique : les cellules granulaires et les cellules pyramidales des champs ammoniques, essentiellement glutamatergiques.

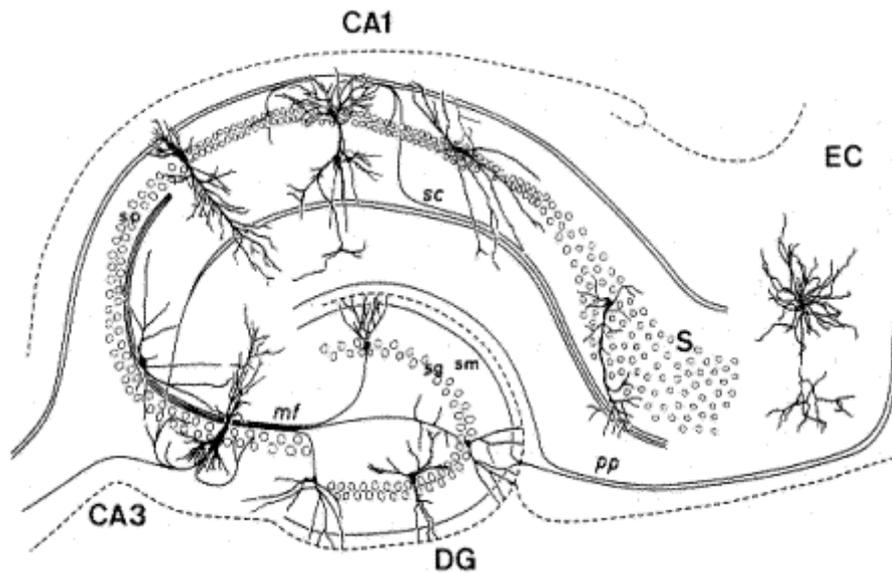


Figure 17 : structure de la formation hippocampique.

CA : Corne d'ammon, DG : gyrus denté, EC : cortex entorhinal, mf : fibre moussues, pp : voie perforante, sc : collatérales de Schaffer, sg : stratum granulosum, sp : stratum pyramidale.

La formation hippocampique présente un profil de connexions intrinsèques bien particulier, nommé circuit trisynaptique. La voie perforante constitue son point de départ et se compose des connexions synaptiques entre le cortex entorhinal et les cellules granulaires du gyrus denté qui projettent à leur tour vers l'aire CA3, constituant les fibres moussues. Les cellules pyramidales de l'aire CA3 émettent des projections nommées collatérales de Schaffer à destination des cellules du CA1 ainsi que des projections dites récurrentes projetant sur d'autres cellules de cette même aire. Enfin, les cellules du CA1 projettent vers le subiculum.

Afférences : les principales afférences hippocampiques proviennent du cortex entorhinal qui émet des projections vers le gyrus denté et les aires CA3 et CA1. La voie perforante permet la réception de la majeure partie des informations en provenance des aires sensorielles. Le gyrus denté reçoit également des projections en provenance des régions sous-corticales telles que le septum, l'hypothalamus et des régions du tronc cérébral (le locus coeruleus et les noyaux du raphé). La voie perforante est aussi constituée de projections axonales en provenance du cortex périrhinal se terminant sur les neurones du CA1 (Liu and Bilkey, 1996). Le CA3 et surtout le CA1 reçoivent également des entrées sous-corticales en provenance des noyaux amygdaliens, du septum (Pikkarainen et al., 1999, Pitkanen et al., 2000) et des entrées thalamiques en provenance des noyaux reuniens.

Efférences : le fornix constitue la principale voie efférente de l'HPC, il permet le transit des informations de l'HPC vers des structures telles que le septum et l'hypothalamus (Chronister and White, 1975). Une autre voie de sortie importante passe par le subiculum qui reçoit des projections du CA1 et qui projette à son tour vers le cortex entorhinal. Ce dernier émet des projections vers

différentes aires associatives telles que le CPF ou le cortex orbito-frontal. En parallèle de ces deux principales voies, l'HPC projette vers diverses structures corticales et différents noyaux de l'amygdale via des projections neuronales essentiellement issues de l'aire CA1.

L'HPC n'est pas une structure unitaire (Moser and Moser, 1998), il possède des fonctions distinctes le long de son axe longitudinal (dorso-ventral chez le rongeur et postéro-antérieur chez l'Homme). Sur la base de différenciations anatomiques (Pitkanen et al., 2000), génétiques (Dong et al., 2009, Fanselow and Dong, 2010) et physiologiques (Segal et al., 2010), l'HPC est généralement divisé en deux régions : l'HPC dorsal et ventral avec des profils de connexion différents notamment avec les noyaux amygdaliens. En effet, par rapport à l'HPC dorsal, la région ventrale reçoit de nombreuses projections de l'ensemble des noyaux de l'amygdale. En revanche, la majorité des projections concernant les informations visuo-spatiales en provenance des cortex sensoriels primaires, via les cortex associatifs et les cortex entorhinal et périrhinal (Amaral & Witter, 1995) aboutissent sur l'HPC dorsal.

De plus, les gènes spécifiquement exprimés dans la région dorsale corrélerent avec ceux exprimés dans des régions corticales, alors que ceux de l'HPC ventral partagent des patterns d'expression de gènes avec l'amygdale et l'hypothalamus. Ces données contribuent à attribuer un rôle « cognitif » pour l'HPC dorsal et à l'inverse, montrent une implication plus importante de la région ventrale dans le comportement émotionnel (Fanselow and Dong, 2010, Segal et al., 2010).

c. Interactions entre le cortex préfrontal et l'hippocampe

Il existe de nombreuses interactions HPC-CPF aussi bien fonctionnelles que structurelles (pour revue, voir Laroche et al., 2000). Des injections de marqueurs rétrogrades et antérogrades ont montré que seules les régions hippocampiques du CA1 et du subiculum projetaient sur le CPF médian et le cortex orbito-frontal (Cavada et al., 1983, Goldman-Rakic et al., 1984, Jay and Witter, 1991, Barbas and Blatt, 1995, Carmichael and Price, 1995). A l'inverse, l'HPC ne reçoit que des projections indirectes du CPF (Goldman-Rakic et al., 1984, Witter et al., 1989, Carmichael and Price, 1995) par l'intermédiaire du thalamus, et plus précisément, du noyau reuniens (Vertes, 2006).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les connexions HPC-CPF ont été étudiés en partie grâce à l'électrophysiologie. Il a notamment été mis en évidence que l'application de série de stimulations à haute fréquence dans l'HPC provoque une potentialisation à long-terme dans le cortex prélimbique (Laroche et al., 1990) chez le rat anesthésié. De plus, la facilitation de la MDT est proportionnelle à la diminution de la réponse synaptique HPC-CPF pendant le délai de rétention (Burette et al., 2000). Ce phénomène de dépression à long-terme permettrait d'augmenter le ratio signal/bruit de fond afin d'inhiber les informations interférentes et de ne conserver que les informations pertinentes nécessaires à la réalisation de la tâche. Cette hypothèse a été confortée récemment par l'utilisation de souris déficientes dans des formes spécifiques de dépression à long

terme qui présentaient des déficits de MDT liés à une incapacité à supprimer des informations précédemment acquises (Nicholls et al., 2008).

Plus récemment, la combinaison de lésions ipsi ou controlatérales dans l'HPC dorsal et le CPF médian a mis en évidence le rôle primordial de l'intégrité de la voie HPC-CPF dans la MDT (Izaki et al., 2008) et son importance pour faciliter le traitement des informations dans la MDT. L'ensemble de ces données montre que la voie HPC-CPF est essentielle à la MDT.

d. Mécanismes moléculaires

La compréhension des mécanismes moléculaires engagés dans les fonctions cognitives est essentielle pour appréhender les dysfonctionnements cognitifs. Les circuits nécessaires au fonctionnement de la MDT sont modulés d'une manière unique et souvent décrit comme à l'opposé des mécanismes moléculaires nécessaires à la consolidation de la MLT (Malleret et al., 2010). La MDT, à l'inverse de la MLT, est un processus éphémère et transitoire ne nécessitant donc pas les mêmes mécanismes moléculaires.

Les neurotransmetteurs dopaminergiques et gabaérgiques sont impliqués dans l'activité neuronale du CPF et dans la MDT. En effet, les niveaux de dopamine augmentent transitoirement pendant un test de MDT dans le CPF chez le rat et chez l'homme (Phillips et al., 2004, Aalto et al., 2005). La dégradation des neurones dopaminergiques et noradrénergique par l'injection de 6-hydroxy-dopamine provoque des troubles de la MDT chez le singe (Brozoski et al., 1979) ou le rat (Simon et al., 1979) montrant l'importance de ces neurotransmetteurs dans la MDT. Des travaux soulignent également l'existence d'une courbe dose-réponse en forme de « U » inversé entre les performances de MDT et la dopamine puisque l'absence ou l'excès de dopamine induisent des déficits de MDT (Williams and Goldman-Rakic, 1995, Zahrt et al., 1997, Arnsten and Goldman-Rakic, 1998, Runyan and Dash, 2005).

L'influence de la dopamine sur le CPF est principalement induite via les récepteurs D1 dans le CPF. Leur activation stimule la voie de signalisation AMPc/PKA (adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A) (Wang et al., 1995), dont l'implication dans la mémoire a tout d'abord été mise en évidence chez l'aplysie (Schacher et al., 1988). Ces changements PKA-dépendants sont nécessaires la consolidation de la MLT chez de nombreuses espèces (de Toledo-Morrell et al., 1984, Milner et al., 1998, Duffy and Nguyen, 2003). En effet, chez le rongeur, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la PKA perturbe la potentialisation à long terme dans l'HPC et détériore la MLT alors que son activation induit l'effet inverse (Ardenghi et al., 1997, Bach et al., 1999). En revanche, l'activation de la voie AMPc-PKA pourrait nuire au fonctionnement de la MDT dans le CPF. En effet, l'activation des kinases et notamment de la PKA, provoque une détérioration des performances de la MDT (Taylor et al., 1999, Runyan and Dash, 2005). A l'inverse, l'inhibition de la voie AMPc-PKA avec de faibles doses de Rp-cAMPS a peu d'effet sur les performances de MDT chez les jeunes rats.

Cependant, il a été démontré que des doses plus élevées de Rp-cAMPS nuisent à la MDT. Ces résultats suggèrent comme pour la dopamine, l'existence d'une courbe dose-réponse en « U » inversé entre l'activité de l'AMPC-PKA et les performances de MDT. L'activation AMPC-PKA dans le CPF pourrait donc être nécessaire pour la MDT notamment lors d'épreuves impliquant de longs délais qui nécessitent des interactions entre le CPF et l'HPC (Runyan and Dash, 2005). En effet, l'inhibition de l'AMPC-PKA dans le CPF, immédiatement avant le test de MDT, induit une altération des performances pour de longs délais de rétention, de l'ordre de la minute (Aujla and Beninger, 2001). L'activation de la PKA pourrait également être nécessaire dans des situations conflictuelles ou lorsque un contrôle cognitif élevé est nécessaire (comparaison, sélection, manipulation d'informations) (Runyan and Dash, 2005). Ces travaux suggèrent que l'activation AMPC-PKA pourrait être bénéfique pour la MDT dans des conditions particulières nécessitant soit des interactions entre l'HPC et le CPF soit dans des situations conflictuelles.

Des travaux de l'équipe confirment ces données et montrent qu'un test de MDT d'alternance spontanée (AS) dans un labyrinthe en T entraîne la phosphorylation de CREB (cAMP response element-binding), un facteur de transcription activé par la PKA dans le CPF et l'HPC, 30 minutes après le début du test (Vandesquille et al., 2013).

Ainsi la balance kinase/phosphatase, apparaît comme un régulateur essentiel de la mémoire, agissant de manière opposée entre la MDT et la MLT. Les phosphatases permettraient alors de réduire le « bruit » créé par les informations interférentes, tout en augmentant le « signal » que constituent les informations pertinentes (Gonzalez-Burgos et al., 2005, Dash et al., 2007).

Troisième partie :
Alcoolisme et sevrage

A. Alcoolisme

Benjamin Rush (1745-1813) et Thomas Trotter (1760-1832) sont les premiers à concevoir l'abus d'alcool comme une pathologie chronique. Rush décrit l'abus d'alcool ou l'ivresse comme une perte de contrôle. Rush est peut-être également le premier à utiliser le terme de « dépendance » dans le sens d'un besoin irrésistible de consommer une substance. De son côté, Thomas Trotter décrit dans un essai médical et philosophique l'effet de l'ivresse sur le corps (1804) et présente la consommation excessive d'alcool comme une condition médicale, « une maladie de la volonté ». Le terme alcoolisme sera introduit plus tard, en 1849 par un médecin suédois, Magnus Huss (1807-1890) dont les patients ayant une surconsommation d'alcool présentaient des affections hépatiques, cardiaques ou neurologiques. L'alcoolisme est dorénavant décrit comme un ensemble de conséquences pathologiques résultant d'une importante consommation de boissons alcooliques.

1. Lésions cérébrales et troubles cognitifs

Très tôt, les conséquences de l'alcool sur le cerveau ont été décrites notamment par Wernicke (1881) et Korsakoff (1890). L'encéphalopathie de Wernicke est un trouble neurologique sévère causé par une carence en thiamine (vitamine B1) résultant, dans la majorité des cas, d'une consommation excessive d'alcool. Cette pathologie se caractérise par une ataxie, un état confusionnel, une ophtalmoplégie, ainsi que d'une perte de la MCT. Ces symptômes sont engendrés par de nombreuses lésions cérébrales dont les noyaux thalamiques et les corps mamillaires. L'aggravation de ces symptômes et en particulier des troubles de la mémoire peut se compliquer en syndrome de Korsakoff caractérisé par l'oubli à mesure (amnésie antérograde). Cette pathologie comprend également une amnésie rétrograde suivant le gradient de Ribot. En revanche, les capacités de mémoire sémantique, de mémoire procédurale et les effets d'amorçage sont préservés. Ce syndrome s'accompagne également de fabulations et d'une anosognosie (méconnaissance/déni de la pathologie) ainsi que d'une apathie et d'un émoussement émotionnel.

La dépendance à l'alcool chez l'homme, est associée à l'apparition d'anomalies neurologiques et à une réduction du volume de nombreuses structures cérébrales (Eckardt and Martin, 1986, Schweinsburg et al., 2001, Fama et al., 2006). Les premières études montraient que le syndrome amnésique était de type diencephalique puisque les études neuropathologiques initiales mettaient en évidence des lésions du thalamus et des corps mamillaires de l'hypothalamus. Ces sites lésionnels étaient classiquement opposés à ceux des patients présentant un syndrome amnésique bi-hippocampique. Cependant, l'amélioration des techniques d'imagerie a permis d'examiner le cerveau

dans son intégralité, mettant en évidence des altérations du CPF, du lobe temporal interne et du cervelet (**Fig.18**). La perte neuronale dans la région frontale est estimée entre 15-23% (Krill et al., 1997, Chanraud et al., 2007). De plus, la diminution de la densité tissulaire dans les régions thalamiques et l'augmentation du volume du liquide céphalorachidien (LCR) dans le troisième ventricule ont spécifiquement été mises en évidence chez les sujets Korsakoff mais non chez les patients alcooliques sans complications neurologiques (Shimamura et al., 1988). Dans cette étude, les troubles cognitifs et mnésiques des patients Korsakoff corrélaient avec ces deux anomalies anatomiques suggérant que les troubles leurs sont spécifiquement associés.

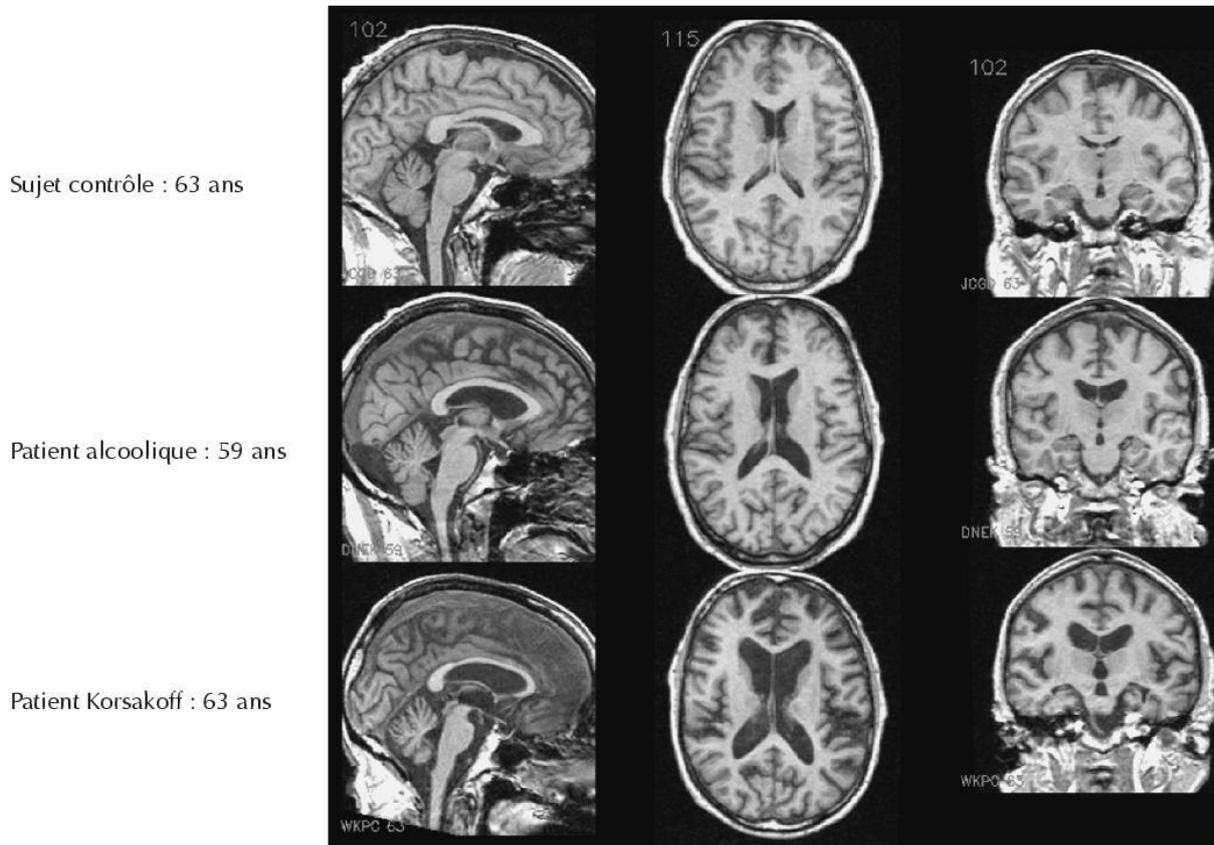


Figure 18 : illustration des effets de l'alcool sur le cerveau du sujet alcoolique et Korsakoff par rapport à un sujet contrôle.

Sur les coupes sagittales, axiales et coronales (de gauche à droite) l'atrophie corticale est nettement visible. Les altérations du lobe temporal interne sont visibles sur les coupes coronales. L'atrophie du corps calleux et du cervelet sont discernables sur les coupes sagittales.

Des lésions cérébrales plus modérées sont également observées chez les patients alcooliques sans pour autant induire un syndrome de Wernicke. Des études de tomodynamométrie trouvent de façon constante une atrophie corticale et une augmentation du rapport ventricule/cerveau (Lishman et al., 1987) chez les consommateurs excessifs chronique d'alcool. L'atrophie du cervelet (Torvik and Torp, 1986) et de la région hippocampique (Bengochea and Gonzalo, 1990) ainsi que l'élargissement des sillons corticaux, de la scissure de Sylvius et de la scissure inter-hémisphérique sont aussi

couramment observés (Haubek and Lee, 1979). Ces derniers présentent également des altérations de la mémoire même si les troubles sont moins sévères que ceux des sujets Korsakoff (Pitel et al., 2007). Par exemple, les capacités d'encodage altérées chez les sujets Korsakoff sont notamment préservées chez les sujets alcooliques. Les études en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle menées chez ces patients suggèrent la mise en place de mécanismes compensatoires qui refléteraient une réorganisation cérébrale fonctionnelle pouvant expliquer la moindre importance des troubles cognitifs par rapport aux sujets Korsakoff (Pfefferbaum et al., 2001).

Les modèles murin d'alcoolisation mettent également en évidence une réduction de la densité cellulaire des corps mamillaires de l'hypothalamus ainsi qu'une perte plus modérée dans le thalamus (antérieur et médiodorsal) et le cortex frontal (Beracochea, 2005). Dans cette même étude, des modifications du nombre et de la morphologie des épines dendritiques des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'HPC sont également décrites (Lescaudron et al., 1989).

2. Principales comorbidités psychiatriques

Sur le plan émotionnel, la dépression et l'anxiété sont les principales comorbidités psychiatriques associées à l'alcoolisme (Regier et al., 1990). L'association entre alcoolisme et dépression est une donnée clinique d'observation courante. En effet, 80% des alcooliques présentent des troubles anxieux et un tiers, une dépression majeure caractérisée (Schuckit and Hesselbrock, 1994, Schuckit et al., 1997). L'alcool produit pourtant un effet euphorisant et de bien être lors de la phase d'absorption chez le sujet normal. Cependant, consommé en grande quantité et de façon chronique, l'alcool a un effet dépressogène alors même que l'alcoolique poursuit son intoxication en espérant un effet positif.

La séquence d'apparition de la dépression et de l'alcoolisme conduit à distinguer deux formes d'alcoolisme : l'alcoolisme primaire et l'alcoolisme secondaire. Dans l'alcoolisme primaire, l'intoxication induit les symptômes dépressifs; en revanche, l'alcoolisme secondaire correspond à une forme d'« auto-traitement » par l'alcool d'un trouble de l'humeur. Dans ce cas, le patient recherche dans l'ingestion répétée d'alcool un soulagement aux troubles anxieux. La dépression induite par l'alcoolisme disparaît après un sevrage prolongé dans 90% des cas (Schuckit and Hesselbrock, 1994).

Les troubles anxieux et la dépression induits par l'alcoolisation sont provoqués par des perturbations moléculaires, de nombreuses altérations des systèmes de neurotransmission (tels que la sérotonine) et également par l'émergence d'altérations de l'axe corticotrope.

3. Action neurochimique de l'alcool

L'action neurochimique de l'alcool est non spécifique. Elle va porter sur l'ensemble des neuromédiateurs (glutamate, dopamine, sérotonine, noradrénaline, GABA) ainsi que sur les seconds messagers intracellulaires (AMP cyclique, protéines kinases A et C, modifications épigénétique...). Dans cette étude nous détaillerons plus en détail l'effet de l'alcool sur la voie AMPc/PKA/CREB.

a. Protéines

L'alcool induit des altérations de la plasticité synaptique et des fonctions neuronales. Ces changements sont provoqués par la prise aigue d'alcool ou par le phénomène de neuroadaptation lié à sa consommation chronique. Ils sont provoqués par une dérégulation des systèmes de signalisation, de la transcription des gènes et de l'expression des protéines. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dépendance à l'alcool et la rechute est devenue un axe majeur de recherche.

Ainsi, outre son implication dans la régulation de multiples fonctions biologiques dont la mémoire, l'apprentissage, la plasticité synaptique, la prolifération cellulaire (Abel and Kandel, 1998, Morrow et al., 2004, Pandey, 2004, Carlezon et al., 2005, Alberini, 2009) le facteur de transcription CREB joue également un rôle central dans le processus de dépendance à l'alcool (Nestler, 2001, Pandey, 2004, Carlezon et al., 2005, Spanagel, 2009). Plusieurs cascades de signalisation ont été identifiées comme des cibles potentielles de l'action de l'éthanol pouvant moduler les fonctions de CREB (Harris et al., 2008, Spanagel, 2009). En effet, l'alcool phosphoryle la sérine 133 de CREB par l'intermédiaire soit de la CaMKII/CaMKIV (protéine kinase calcium/calmoduline dépendante II et IV), soit de la PKA ou de la protéine MAPK (mitogen-associated protein kinase) (**Fig. 19A**).

En particulier, l'alcool en potentialisant l'action de l'adénylate cyclase augmente l'activité de la PKA lorsque l'enzyme a été stimulée par la dopamine via le récepteur D1 (Tabakoff and Hoffman, 1979). Des études de culture cellulaire confirment qu'un traitement aigu à l'alcool induit la translocation des sous-unités catalytiques de la PKA dans le noyau, provoquant la phosphorylation de la protéine CREB (Dohrman et al., 1996, Constantinescu et al., 1999). D'autre part, la manipulation de la phosphorylation de CREB via l'activation ou l'inhibition pharmacologique de la PKA confirme le rôle majeur de CREB dans la régulation de la consommation d'éthanol (Yao et al., 2002, Pandey et al., 2003, Zhang and Pandey, 2003, Misra and Pandey, 2006). L'inhibition de la PKA induit également une réduction des effets sédatifs de l'éthanol, suggérant que cette voie de signalisation pourrait être impliquée dans les phénomènes de tolérance à l'alcool (Lai et al., 2007). De même, des souris transgéniques dépourvues de la sous-unité régulatrice de la PKA présentent une diminution de la sédation induite par l'alcool et une augmentation de la consommation d'alcool (Thiele et al., 2000). Ces résultats dans leur ensemble, suggèrent que la réduction de la PKA joue un rôle dans la tolérance à l'alcool et dans le développement de la dépendance.

Des anomalies de la fonction de CREB ont également été observées dans le noyau accumbens, le cortex et le cervelet après la consommation aiguë d'alcool mais de moindre importance après une consommation chronique (Yang et al., 1996, Yang et al., 1998a, Yang et al., 1998b). En effet, les données de la littérature montrent que, lors d'une consommation chronique d'alcool (CCA), les niveaux de pCREB et de liaison CRE-ADN ne sont pas affectés (Pandey et al., 1999b, Pandey et al., 2001).

D'autres travaux ont étudiés le rôle de CREB dans la dépendance et la préférence à l'alcool. Ces études montrent que les rats « préférant » l'alcool présentent des niveaux de pCREB et une activité de liaison CRE-ADN faible dans l'amygdale, par rapport aux rats « non préférant » (Pandey et al., 1999a). Cette perturbation corrèle avec des comportements de type anxieux et l'augmentation de la consommation de l'éthanol (Pandey et al., 2005). La restauration de pCREB dans l'amygdale par l'injection d'un activateur de la PKA (Sp-cAMPS) a permis de diminuer les comportements de type anxieux ainsi que la consommation d'éthanol chez des rats « préférant » l'alcool (Pandey et al., 2005). Des résultats comparables ont été observés chez la souche de souris C57BL/6 qui a une forte appétence pour l'alcool et qui présente conjointement des niveaux de CREB et pCREB faibles dans le noyau accumbens ou les régions amygdaliennes par rapport aux souris de la souche DBA/2 (Misra and Pandey, 2003). Ces résultats suggèrent que la déficience de CREB peut promouvoir la consommation de l'éthanol, la dépendance et les comportements de type anxieux.

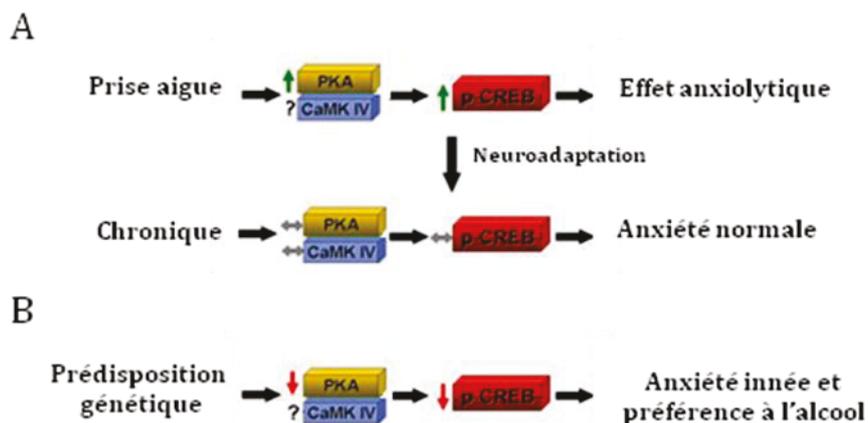


Figure 19 : modèle hypothétique de l'action de l'alcool dans l'amygdale sur les protéines kinases et CREB impliqués dans la régulation de l'anxiété.

(A) Durant la prise aiguë d'alcool où la consommation chronique. (B) ainsi que l'implication des protéines kinases et de CREB dans les prédispositions génétiques à la dépendance à l'alcool.

Au vu de l'ensemble de ces éléments, CREB apparaît être un médiateur important des changements neuronaux associés à la consommation d'alcool.

En outre, plusieurs études ont identifié de nouveaux mécanismes de l'action de l'alcool, dit épigénétiques, qui correspondent au remodelage de la chromatine induit par des modifications post-

traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation...) des histones. Ces mécanismes sont notamment induits par la protéine CBP (CREB-binding protein) qui possède une activité acétyltransférase intrinsèque et qui est recrutée par CREB lors de son activation. Ainsi, les perturbations de CREB induisent également des modifications de l'état d'acétylation des histones et donc de l'activité transcriptionnelle (Pandey et al., 2008, Shukla et al., 2008).

b. Neurotransmetteurs

L'alcool a de nombreuses actions sur le système nerveux central et perturbe l'ensemble des neurotransmetteurs. Son action étendue est possible car l'alcool passe librement la barrière hématoencéphalique et son insertion dans la double couche lipidique cellulaire altère la fluidité de la membrane, les récepteurs, les canaux ioniques et le passage intracellulaire du glucose (Goldstein and Chin, 1981). L'alcool agit notamment sur les systèmes gabaergique, glutamatergique mais aussi cholinergique.

L'étude des deux principaux systèmes de neurotransmission, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et le glutamate a permis de mieux comprendre le mode d'action de l'alcool sur le cerveau et son action addictive. Le rôle du GABA en tant que médiateurs de l'action de l'alcool, est en partie fondé sur la découverte des benzodiazépines qui agissent par l'intermédiaire des récepteurs GABA-A. Les similitudes entre les effets comportementaux produits par les benzodiazépines et les effets de l'alcool (réduction de l'anxiété, sédation puis tolérance et dépendance), ont fait du récepteur GABA-A un candidat de choix comme médiateur de l'action de l'alcool sur le cerveau. L'alcool module la libération du GABA dans certaines régions cérébrales et provoque l'hyperpolarisation de la membrane, inhibant ainsi l'activation du neurone. Ces données ont été confortées par des études d'électrophysiologie notamment dans les régions corticales (Reynolds et al., 1992). L'identification, par la suite, des différentes sous-unités qui composent les récepteurs GABA-A a permis de préciser l'action hétérogène de l'alcool, notamment les différences régionales. Le récepteur GABA-A est un pentamère (cinq sous-unités) qui se compose de la combinaison de 6 sous-unités particulières de α , β , γ , δ , ϵ , et θ (Hevers and Luddens, 1998, Mohler et al., 1998). Il a été démontré que l'alcool agirait plus particulièrement sur les sous-unités α (Malminen and Korpi, 1988, Uusi-Oukari and Korpi, 1989) et δ (Wallner et al., 2003) même si l'exacte contribution des sous-unités n'est pas encore clairement définie. Ainsi, les zones plus sensibles à l'effet de l'alcool sont notamment les régions exprimant la sous-unité δ particulièrement présente dans le noyau accumbens (NAC), ainsi que le thalamus, les régions corticales, l'HPC et le cervelet (Pirker et al., 2000, Schwarzer et al., 2001).

Comme vu précédemment, l'action de l'alcool sur le cerveau implique les protéines kinases (PKA et PKC). Ces protéines interviennent dans les effets de l'alcool sur les fonctions du récepteur GABA-A (Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009). L'éthanol pourrait modifier le fonctionnement du

récepteur GABA-A en modulant la composition de sous-unités, par l'intermédiaire du mécanisme de phosphorylation, dépendant des PKA (Kumar et al., 2012, Carlson et al., 2013). L'alcool est aussi responsable d'une diminution des récepteurs aux benzodiazépines d'environ 30% dans l'HPC et le CPF (Freund and Ballinger, 1991). L'ensemble des perturbations du système gabaergique pourrait rendre compte d'épisodes d'amnésie antérograde et de difficultés d'apprentissage.

L'alcool perturbe également le système glutamatergique. Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau, impliqué notamment dans la différenciation neuronale, la plasticité synaptique et la mémoire. L'alcool induit une réduction du pouvoir excitateur du glutamate sur le récepteur NMDA entraînant, à long terme, l'augmentation du nombre de récepteurs. Ainsi, si les effets aigus d'une prise d'alcool sont essentiellement sédatifs, la CCA amène progressivement une "hypersensibilité" des récepteurs NMDA au glutamate ainsi qu'une "désensibilisation" des récepteurs GABAergiques. C'est ce type d'adaptation qui causerait l'état d'excitation caractéristique du sevrage à l'alcool.

L'alcoolisation modifie également la neurotransmission sérotoninergique. Ainsi, les taux de 5-HIAA (acide 5-hydroxyindolacétique), un métabolite de la sérotonine, sont significativement abaissés dans le liquide céphalorachidien des sujets alcooliques. Ces modifications pourraient expliquer la fréquence des troubles dépressifs chez les alcooliques.

c. Perturbations de l'axe corticotrope

L'alcool induit plusieurs effets contrastés sur l'axe corticotrope. L'alcool est notamment décrit comme un facteur de stress physiologique puisqu'il entraîne l'activation de l'axe corticotrope (Mendelson and Stein, 1966). Ce phénomène a notamment été caractérisé chez le rongeur, où l'ingestion d'éthanol induit l'activation de l'axe corticotrope via la libération de CRH et d'ACTH (Rivier et al., 1984, Rivest and Rivier, 1994, Lee et al., 2004). Chez les buveurs occasionnels, de fortes doses d'alcool (supérieur à 100 mg) augmentent les niveaux de cortisol (Waltman et al., 1993). En revanche, chez les alcooliques, la réactivité de l'axe corticotrope est atténuée pendant l'administration aiguë d'alcool (King et al., 2006). Cette observation peut être liée au processus général de tolérance lors de la consommation excessive et prolongée d'alcool. De plus, la CCA dérégule l'axe corticotrope en entraînant l'augmentation du niveau basal de cortisol (Iranmanesh et al., 1989, Richardson et al., 2008). Paradoxalement, au cours de la dépendance à l'alcool, les changements de l'équilibre physiologique de l'axe corticotrope entraînent une diminution de sa réactivité (Koob and Le Moal, 2001). Ces perturbations et l'exposition excessive aux hormones du stress (McEwen, 2007) sont impliquées dans le développement des troubles psychiatriques chez le sujet alcoolique, notamment la dépression et la dépendance. En effet, l'administration de corticostéroïde induit chez le rat une augmentation de la prise volontaire d'alcool. A l'inverse, l'injection de metyrapone (inhibiteur de la

synthèse de corticostérone) (Fahlke et al., 1994, Fahlke and Hansen, 1999) ou de mifépristone (antagoniste des GR) entraîne une diminution de la prise d'alcool (Koenig and Olive, 2004). L'effet facilitateur des GCs sur la prise d'alcool pourrait être provoqué par leur action sur les circuits de récompense en situation de stress, notamment en renforçant la valence positive (anxiolytique et/ou appétitive) de l'alcool (Piazza and Le Moal, 1997, Cho and Little, 1999).

B. Sevrage à l'alcool

Le sevrage est défini comme l'arrêt de la consommation d'alcool, qu'il soit involontaire ou qu'il s'inscrive dans une perspective thérapeutique chez l'alcoololo-dépendant. Le syndrome de sevrage recouvre les manifestations symptomatiques survenant immédiatement ou de façon différée après l'arrêt de la consommation. Ces manifestations traduisent un état de manque psychique, comportemental et physique. Le syndrome de sevrage associe plusieurs types de manifestations :

- Troubles subjectifs : anxiété, agitation, irritabilité, cauchemar, insomnie
- Troubles neurovégétatifs : sueurs, tremblements, tachychardie, hypertension artérielle
- Troubles digestifs : anorexie, nausées, vomissements

Le tableau clinique peut induire des signes confusionnels (troubles de la concentration, de la mémoire, du jugement), des hallucinations, le delirium tremens, des convulsions ou de l'hyperthermie. Le syndrome de sevrage disparaît dans la majorité des cas dans les dix jours après la cessation de la consommation d'alcool.

Cependant, les traitements pharmacologiques actuels restent insuffisants face à l'addiction à l'alcool. De nombreuses études sur le sevrage montrent que, malgré la prise en charge de patients alcoololo-dépendants dans des services spécialisés, un grand nombre de sevrage échoue. En effet, une étude réalisée en 2007, dans un centre de cure ambulatoire en alcoologie, menée sur 115 malades, révèle un taux d'abstinents à 6 mois de seulement 54,8% chez les patients encore suivis (Gelsi et al., 2007). Dans deux autres études, le taux d'abstinence était seulement de 28,5% (Nalpas et al., 2002, Favre et al., 1997). Ce taux a également été retrouvé cinq ans après le début du sevrage dans l'étude de l'EVA (1997), réalisée par la Société Française d'Alcoologie portant sur 1043 patients alcoololo-dépendants ayant bénéficié d'un sevrage hospitalier en France (Favre et al., 1997).

1. Atteintes neurobiologiques lors du sevrage

a. Lésions cérébrales

La distinction entre la période d'alcoolisation et la période de sevrage est importante puisque les effets délétères du sevrage ne sont pas nécessairement identiques à ceux de l'alcool et peuvent aggraver les dommages cérébraux. À l'appui de cette idée, le traitement à l'éthanol (4 mois d'alcoolisation à 9%) suivi d'un sevrage entraîne une perte neuronale dans l'HPC des souris, alors que l'éthanol, en soi, ne cause pas de perte neuronale significative (Phillips and Cragg, 1983). De même, une étude, chez le rat, a montré que l'alcoolisation (13 mois) induit une importante perte de cellules

pyramidales dans les régions CA1 (18%) et CA3 (19%) de l'HPC et que le sevrage (6 semaines) provoque une aggravation de la dégradation et de la perte des neurones pyramidaux de 15% par rapport à des animaux non sevrés (Lukoyanov et al., 1999). De nombreuses études confirment une perte cellulaire dans les régions hippocampiques après un sevrage (Riley and Walker, 1978, Pentney, 1982, Lescaudron and Verna, 1985). Le sevrage et non l'alcoolisation, entraîne également l'atrophie et le rétrécissement des corps cellulaires des neurones corticaux (Nagy et al., 2001).

Cependant, durant les mois qui suivent le sevrage, une récupération partielle du volume du cerveau, caractérisée par l'augmentation de la substance blanche et le volume de la matière grise ainsi que par la réduction de taille des sillons et des ventricules a été observée (Bendszus et al., 2001, Agartz et al., 2003, Gazdzinski et al., 2005, Bartsch et al., 2007, Gazdzinski et al., 2010, Monnig et al., 2013). Certaines régions cérébrales peuvent être recrutées durant le sevrage pour compenser les dommages liés à la consommation d'alcool et permettre ainsi de maintenir certaines fonctions cognitives (Fama et al., 2004, Marinkovic et al., 2009). Ainsi, Lescaudron (1989) rapporte une récupération des épines dendritiques des neurones pyramidaux de l'HPC après 4 semaines de sevrage, par rapport aux souris non sevrées.

b. Altération de la mémoire lors du sevrage

Des études neuropsychologiques ont montré que les alcooliques récemment sevrés présentent une altération des fonctions cognitives, en particulier, de la mémoire déclarative, de la MCT et visuo-spatiale (Nixon et al., 1995, Oscar-Berman and Hutner, 1993, Parsons et al., 1987). Un certain nombre de ces déficiences perdure même après une période de sevrage d'un mois, en particulier les troubles de résolution de problèmes (Joyce and Robbins, 1991, Nixon and Parsons, 1991, Beatty et al., 1993, Sullivan et al., 1993), de MCT (Riege et al., 1981, Becker et al., 1983, Brandt et al., 1983), les capacités visuo-spatiales (Leber et al., 1981, Beatty et al., 1996), et les habiletés perceptuelles et motrices (York and Biederman, 1991).

Le sevrage peut conduire à une aggravation des déficits cognitifs. Une étude a notamment montré que le nombre de sevrage est un facteur prédictif de l'apparition ou du degré des déficits cognitifs (Glenn et al., 1988, Errico et al., 1993, Errico et al., 2002). Chez le rongeur, certains troubles de la mémoire se développent ou s'aggravent après le sevrage à l'alcool. En effet, des troubles d'apprentissage, de MLT (Farr et al., 2005) et de mémoire de référence (Lukoyanov et al., 1999) n'ont été observés qu'après le sevrage. Des déficits de MDT spatiale dans un test d'AS (Celerier et al., 2000, Beracochea, 2005) et des déficits de reconnaissance d'objet ont également été démontré durant la phase du sevrage (Jacquot et al., 2008).

2. Principales comorbidités psychiatriques

L'abus d'alcool et le sevrage peut induire le développement de troubles de l'anxiété, la dépression ainsi que d'autres séquelles psychiatriques (Schuckit and Hesselbrock, 1994, Pandey, 2004, Conway et al., 2006). En effet, une étude longitudinale a montré que les patients sevrés présentaient des troubles anxieux et des pensées pessimistes associés au désir de boire (Voltaire-Carlsson et al., 1996). La grande majorité des études révèle des troubles anxieux au moment du sevrage suivis d'un effondrement de la prévalence après 10 jours de sevrage. Par exemple, dans une étude portant sur 82 patients alcooliques, le diagnostic de dépression était retenu chez 67% des patients en début de sevrage puis chez 13% après 7 à 10 jours. Seul 10 à 15 % des épisodes dépressifs présents au moment du sevrage persistent après un mois (Davidson, 1995). De nombreuses études menées chez les rongeurs confirment la présence de troubles anxieux durant la période aigue du sevrage dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Wilson et al., 1998, Pandey et al., 1999b, Valdez et al., 2002, Doremus et al., 2003, Pandey et al., 2003, Kliethermes, 2005). L'anxiété induite par le sevrage se manifeste également par des comportements d'anhédonie ou encore par une attitude de résignation chez le rongeur (Rasmussen et al., 2001, Neumann et al., 2011).

L'état dysphorique pendant le sevrage à l'alcool est un facteur important à la fois dans le maintien de la consommation d'alcool et le développement éventuel d'une dépendance à l'alcool (Koob, 2003, Pandey, 2004). En effet, deux tiers des patients présentant une rechute dépressive ont en parallèle une rechute alcoolique (Hasin et al., 1996). D'après cette étude, les améliorations ou à l'inverse les rechutes sont majoritairement simultanées. Il a également été démontré qu'un stress psychosocial sévère augmente le taux de rechute (Brown et al., 1995). L'implication des GCs a été mise en cause dans les phénomènes de rechute et d'anxiété (Richardson et al., 2008). Ces résultats démontrent le caractère intriqué des troubles et l'intérêt de mieux comprendre l'apparition des troubles anxieux associés au sevrage alcoolique afin de prévenir ou réduire le phénomène de rechute.

3. Perturbations neurochimiques durant le sevrage

a. Protéines

A l'inverse de la prise aigue d'alcool ou de sa consommation chronique, le sevrage induit une diminution de pCREB. Toutefois, la régulation de l'activation de pCREB par l'alcool semble varier selon la région du cerveau examinée. Par exemple, contrairement à l'HPC, le sevrage à l'alcool, mais non l'alcoolisation chronique, diminue les niveaux de pCREB dans les structures corticales (Pandey et al., 1999b, Pandey et al., 2001, Bison and Crews, 2003). De plus, les niveaux de liaison CRE-ADN sont diminués de façon significative dans les régions corticales durant le sevrage à l'alcool (Pandey et al., 1999b, Pandey et al., 2001). La diminution de pCREB dans l'amygdale corrèle avec l'apparition

des comportements de type anxieux, 24 heures après le sevrage à l'alcool (**Fig. 20**) (Pandey et al., 2003). A l'inverse, l'augmentation pharmacologique des niveaux de pCREB dans l'amygdale via l'injection d'un activateur de la PKA empêche le développement des comportements de type anxieux associés au sevrage (Pandey et al., 2003). Il a donc été proposé que la diminution de l'activité CREB entraîne une réduction de l'expression de gènes, dont le neuropeptide Y (NPY) et le facteur neurotrophique, BDNF impliqués respectivement dans l'anxiété et la dépression.

Le sevrage modifie la fonction CREB en modulant des cibles en amont. Cependant aucun effet n'a été démontré sur les niveaux du domaine catalytique de la PKA dans les structures corticales ou amygdaliennes durant le sevrage (Pandey et al., 2001, Pandey et al., 2003). Le sevrage pourrait donc modifier l'activité de pCREB via la régulation des CaMKs dont l'activité est dépendante des niveaux de Ca²⁺ intracellulaire (Wayman et al., 2008). En effet, diverses études ont mis en évidence le rôle de l'alcool dans la régulation de CREB via la CaMKIV. Il a notamment été montré que le sevrage induisait une diminution de CaMKIV et des niveaux pCREB dans les structures corticales et l'amygdale (Pandey et al., 2001, Pandey et al., 2003).

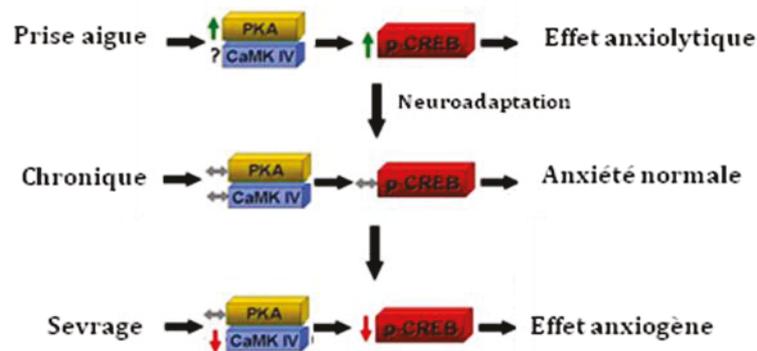


Figure 20 : modèle hypothétique de l'action de l'alcool dans l'amygdale sur les protéines kinases et CREB impliquées dans la régulation de l'anxiété durant la prise aigue d'alcool, la consommation chronique et le sevrage, d'après monnat (2009).

Un autre mécanisme de choix qui pourrait caractériser les actions du sevrage sur les fonctions cognitives dépendantes du CPF est la dérégulation de l'acétylation des histones. Des altérations de l'activité de pCREB pourraient être impliquées dans les processus mnésique notamment en initiant la transcription génique via le recrutement d'un co-activateur qui possède une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque. En effet, l'acétylation des histones, en entraînant la relaxation de la chromatine, permet l'expression de gènes nécessaires à la formation de la mémoire (Chrivia et al., 1993), à l'activité de l'HPC (Day and Sweatt, 2011, Peixoto and Abel, 2013) et du CPF (Bredy et al., 2007, Stafford et al., 2012, Sui et al., 2012, Wang et al., 2012). De plus, les diminutions de l'acétylation des histones et de l'activité HAT dans les structures corticales et hippocampiques corrélient avec la persistance d'altérations comportementales au cours du sevrage après une CCA chez le rat (Pascual et al., 2012). L'implication de l'acétylation des histones dans le développement des

comportements anxieux et dans les déficits d'expression de gènes pendant l'abstinence (Pandey et al., 2008, Mizuo et al., 2012) a été démontré, puisque ces troubles sont supprimés après le blocage des histones déacétylases (Moonat et al., 2010, Arora et al., 2013, You et al., 2014).

b. Neurotransmetteurs

La cessation abrupte de la consommation d'alcool produit une hyperactivité des acides aminés excitateurs, en particulier du glutamate par l'intermédiaire des récepteurs NMDA, dont le nombre de récepteurs est augmenté après une alcoolisation chronique. L'hyperexcitabilité est également provoquée par le moindre effet inhibiteur du système GABAergique, où le nombre de récepteurs est diminué. Cet état d'hyperexcitabilité du système nerveux central se traduit par une augmentation de l'activité du système catécholaminergique et notamment par l'hyperactivité adrénergique responsable de l'apparition de la plupart des manifestations physiques observées lors du sevrage à l'alcool (sueurs, tremblements, tachycardie...).

De plus, au moment du sevrage alcoolique, la stimulation des récepteurs GABA par l'éthanol cesse brusquement et contribue à l'activation de l'axe corticotrope.

Les modifications du métabolisme de la sérotonine sont également présentes au moment de l'alcoolisation et du sevrage aigu pouvant jouer un rôle dans les états dépressifs transitoires.

c. Perturbations de l'axe corticotrope

A l'inverse de la période d'alcoolisation, le sevrage induit l'activation de l'axe corticotrope chez l'abstiné (Willenbring et al., 1984, Wand and Dobs, 1991). Durant la période aiguë du sevrage, les niveaux de cortisol sont élevés (Iranmanesh et al., 1989), puis sont ensuite normalisés après 7 à 10 jours de sevrage au niveau plasmatique (Adinoff et al., 1991). Des études révèlent également un émoussement durable de l'activité de l'axe corticotrope et notamment une réponse atténuée du CRH à l'injection de cortisol exogène (Adinoff et al., 1990) et à un stress (Errico et al., 1993, Bernardy et al., 1996, Lovallo et al., 2000, Anthenelli et al., 2001) durant le mois qui suit le sevrage. De nombreuses études confirment l'augmentation du cortisol durant la première semaine de sevrage suivis d'une diminution significative des niveaux de cortisol pouvant même être à long terme, en dessous de la normale (Majumdar et al., 1989, Esel et al., 2001, Keedwell et al., 2001, Walter et al., 2006). Après 3 ans de sevrage, des taux d'ACTH et de cortisol plasmatiques sont similaires par rapport aux témoins sains (Munro et al., 2005). Cependant, cette étude n'a pas permis de déterminer si les alcooliques retrouvent un niveau normal de réponse de l'axe corticotrope après une abstinence prolongée. Ces résultats suggèrent que les troubles de l'activité de l'axe corticotrope évoluent au fil du temps. Ainsi chez les personnes alcoolodépendantes, les épisodes de sevrage suivis des épisodes d'intoxication

provoquent des cycles d'hypo puis d'hyperactivité de l'axe corticotrope, contribuant aux atteintes neuronales mais également aux comportements de manque et de rechute. Pourtant, même si ces études montrent un rétablissement, voire une diminution de la sécrétion de GCs au niveau plasmatique, une étude a montré une perturbation durable au niveau cérébral spécifiquement après un sevrage à l'alcool (Little et al., 2008). En effet, il a été démontré, chez la souris et le rat que bien que l'hypercorticotéronémie est transitoire au niveau plasmatique (24 heures), elle demeure prolongée (au moins deux mois) dans le CPF, l'HPC et le thalamus, après l'arrêt de la consommation prolongée d'alcool.

Quatrième partie
Relations entre émotion et mémoire et
objectifs de l'étude

A. Processus cognitifs affectés par le stress

D'un point de vue neurobiologique, émotions et mémoire sont intimement liées. Depuis une trentaine d'années, hypothèses et travaux scientifiques se sont succédés pour essayer de cerner les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent cette relation. Actuellement, les émotions occupent une place importante dans l'étude des comportements et de la mémoire. En effet, l'absence d'éveil émotionnel pendant une tâche rend l'apprentissage difficile, voire impossible. A l'inverse, un stress aigu peut avoir des effets délétères sur la mémoire, en particulier sur la mémoire de type déclaratif et la MDT. D'autres études ont essayé d'identifier les systèmes mis en jeu dans des situations engendrant des émotions négatives, notamment celles induites par un stress.

L'apprentissage et les différentes phases de la mémoire (encodage, consolidation et rappel/rétention) sont largement influencés par les catécholamines et les GCs qui peuvent constituer un «filtre sélectif» des informations pertinentes à mémoriser au vu de l'expérience. En effet, l'éveil émotionnel induit par un agent stressant apparaît comme un élément crucial dans les effets observés sur la mémoire. Des études réalisées chez le rat ont montré que la consolidation d'une tâche stressante est améliorée par la sécrétion de catécholamines et des GCs qui a lieu durant l'apprentissage de cette tâche (De Kloet et al., 1998, de Kloet et al., 1999). Ce constat est vérifié pour les apprentissages mettant en jeu la formation hippocampique (tâche d'évitement, spatial ou conditionnement classique). L'amélioration des performances cognitives a également été obtenue par une injection de GCs juste après l'apprentissage qui entraîne l'activation des récepteurs GR dans l'amygdale (McGaugh and Roozendaal, 2002, Roozendaal et al., 2002). D'une manière générale, un événement émotionnellement marqué sera mieux rappelé qu'un événement neutre (Cahill and McGaugh, 1998, Sandi, 1998). Au contraire, l'exposition à un stress extrême, traumatique ou chronique peut avoir l'effet inverse et provoquer une perte de mémoire et des troubles cognitifs. Il apparaît qu'un niveau d'occupation modéré des récepteurs GR permet un apprentissage optimal, tandis qu'une suractivation de ces récepteurs devient délétère pour l'apprentissage. Les niveaux de performances mnésiques suivent une courbe en « U » inversé selon le niveau d'occupation des GR dans l'HPC (Oitzl et al., 1994)

A l'inverse, l'expérimentation a permis de mettre en évidence que l'exposition à un stress altère l'exécution de tâches complexes dépendantes du CPF. Des distracteurs émotionnels peuvent diminuer l'activité du CPF dorsolatéral chez des sujets effectuant une tâche de MDT. Par exemple, parler en public, nuit à la flexibilité cognitive (Alexander et al., 2007) et à la MDT (Luethi et al., 2008) mais améliore le conditionnement classique, ainsi que la mémoire spatiale dépendante de l'HPC. Chez le rongeur, les études montrent qu'un stress de choc électrique inéluctable perturbe les processus attentionnels (Minor et al., 1984) dans un labyrinthe en Y. En revanche, quand le stress est perçu

comme contrôlable, les réponses déclenchées par le stress sont inhibées (Amat et al., 2006) par le CPF et l'HPC, deux structures pouvant inhiber l'action des GCs (Diorio et al., 1993). L'action néfaste des GCs sur la MDT a été démontrée dans de nombreux paradigmes. En effet, l'augmentation pharmacologique de cortisol pendant ou juste après la rétention perturbe la MDT (Lupien et al., 1999, Wolf et al., 2001, Terfehr et al., 2011, Vaz et al., 2011). De même, les rats développent des troubles de MDT à composante spatiale lorsqu'ils sont placés dans un environnement stressant entre deux phases de rappel, dans un labyrinthe radial à 14 bras (Diamond et al., 1996). Chez le rongeur, un traitement systémique avec des GCs induit également des déficiences de la MDT (Roosendaal et al., 2004).

Les effets délétères du stress sur la mémoire sont notamment dus à un dysfonctionnement du réseau hippocampo-préfrontal. Une étude réalisée au sein de l'équipe montre que l'augmentation de la corticostérone intracérébrale après un stress induit un changement du pattern de rappel. En effet, la corticostérone favorise le rappel des informations qui dépendent du CPF au détriment de celles qui dépendent de l'HPC dorsal (Dominguez et al., 2014).

Au niveau moléculaire, les taux excessifs de noradrénaline provoqués par un stress peuvent induire un dysfonctionnement du CPF et de la MDT. Ils peuvent moduler l'activité de la voie AMPc/PKA et de la voie CaMKII/PKC en engageant différents types de récepteurs. L'hyperactivité de la voie CaMKII et de la PKC (Birnbaum et al., 2004) ainsi que la perturbation de la voie AMPc/PKA (Taylor et al., 1999) conduisent à l'émergence de troubles de la MDT (Arnsten, 2009). L'effet du stress sur la MDT est également soutenu par l'action des GCs qui interagissent avec les récepteurs adrénergiques de type α et β pour augmenter le taux d'AMPc (Stone et al., 1987, Duman et al., 1989). Cependant, les GCs stimulent également d'autres neurotransmetteurs dans le CPF et notamment le glutamate et la dopamine (Moghaddam, 1993, Thomas et al., 1994, Morrow et al., 2000). L'effet des GCs sur la MDT pourrait donc résulter des nombreuses interactions entre la noradrénaline et les autres systèmes de neurotransmetteurs dans le CPF.

B. Objectifs de l'étude

Un des objectifs de cette thèse est de déterminer l'implication des GCs dans l'émergence du syndrome de sevrage et plus particulièrement dans le développement des troubles anxieux et cognitifs. Les manifestations psychiques, physiques et les troubles cognitifs survenant au moment du sevrage constituent des facteurs de risques importants de rechutes ; il est donc crucial de déterminer les mécanismes moléculaires et les structures cérébrales impliqués dans l'émergence et le maintien des perturbations induites par un sevrage à l'alcool.

En effet, certaines altérations cognitives s'aggravent ou n'apparaissent qu'après le sevrage à l'alcool. Comme vu précédemment, l'étude de Lukoyanov (1999) a notamment montré que des rats alcoolisés depuis 13 mois de façon chronique n'ont pas de troubles de la mémoire de référence, alors que les rats sevrés depuis 6 semaines et soumis à la même procédure d'alcoolisation, présentent une détérioration de ces mêmes performances. De plus, des études ont montré que les faibles performances cognitives de patients sevrés corrélaient avec les quantités d'alcool consommé et avec le nombre d'épisodes de sevrage. **Il y aurait donc au moment du sevrage un ou des événements marquants qui pourraient rendre compte de l'aggravation des troubles cognitifs. Cet événement pourrait être l'hyperactivité de l'axe corticotrope qui survient dès les premières heures suivant le sevrage à l'alcool.** Une hyper-corticostéromie prolongée (au moins jusqu'à 2 mois) dans certaines zones spécifiques du cerveau et plus particulièrement dans le CPF et l'HPC (Little et al., 2008) pourrait notamment être impliquée. Cependant, à l'inverse de la dépression, le lien entre l'hyper-corticostéromie intracérébrale prolongée et l'émergence des troubles cognitifs pendant le sevrage n'a pas été démontré. En effet, lors d'une dépression, l'implication des GCs dans le développement d'altérations cognitives est bien établie. Il a notamment été montré, chez les dépressifs, que les hauts niveaux de cortisol salivaire sont associés aux perturbations cognitives.

D'un point de vue fonctionnel, l'augmentation excessive ou chronique du taux de GCs peut perturber les fonctions cognitives par le biais des MR et GR et ainsi modifier l'activité des voies de signalisation intracellulaire telles que la voie AMPc/PKA. Cette voie de signalisation régule la phosphorylation de CREB et est impliquée dans l'anxiété et la MDT.

L'ensemble de ces données nous a amené à émettre l'hypothèse que **l'hyper-corticostéromie centrale, induite par un sevrage à l'alcool, pourrait participer au développement et au maintien des troubles de la MDT via une perturbation de la phosphorylation de CREB, par un mécanisme moléculaire comparable aux effets résultant d'un stress chronique.**

En outre, bien que l'altération de l'axe corticotrope soit très différentes (1) dans un cas modélisés par un stress physiologique provoqué par un sevrage à l'alcool et (2) dans l'autre cas, par

une procédure de SCLI modélisant la dépression, de nombreuses perturbations neurophysiologiques ou cognitives apparaissent communes à ces deux pathologies. Cependant, une différence majeure qui émerge des données précédemment énoncées est qu'à l'inverse de la dépression, le sevrage semble perturber durablement les taux de GCs spécifiquement au niveau central. **Nous avons donc cherché à déterminer l'implication des GCs aux niveaux plasmatique et intracérébral dans l'émergence et le maintien des troubles de la MDT et de l'activité de CREB induits par un sevrage à l'alcool ou par une procédure de stress chronique.**

Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'impact du sevrage sur la MDT, en utilisant une tâche d'AS connue pour induire l'activation de CREB, spécifiquement dans le CPF et l'HPC dorsal, 30 minutes après le début du test. De plus, les souris sevrées ont été comparées à des souris soumises à la procédure de SCLI, qui présentent des troubles anxieux et cognitifs sans avoir été exposées à l'action néfaste de l'alcool. Un autre aspect important de cette étude repose sur le caractère **prolongé** des déficits de MDT après un sevrage à l'alcool. Nous avons entrepris de déterminer si les perturbations de l'axe corticotrope, associées au sevrage, peuvent avoir une action délétère et durable également sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la MDT.

Pour cela, nous avons dans un premier temps, caractérisé les troubles cognitifs et moléculaires spécifiquement dus au sevrage et non à l'alcoolisation; dans un second temps, nous avons défini l'implication de la phosphorylation de CREB dans l'émergence et le maintien des troubles de la MDT. Les effets de la modulation de la voie AMPc/PKA sur pCREB et sur la MDT, après un sevrage à l'alcool (aigu ou prolongé) ou après une procédure de stress chronique, ont également été testés.

Nous avons alors entrepris de caractériser les perturbations de l'axe corticotrope, aux niveaux périphérique et central, après le sevrage (aigu ou prolongé) ou après une procédure de stress chronique.

Enfin, compte tenu des résultats obtenus, nous avons essayé de déterminer le lien causal entre la perturbation de la MDT, de pCREB et l'altération de l'axe corticotrope en agissant pharmacologiquement, soit sur les taux de corticostérone centraux, soit sur les récepteurs aux GCs au sein du CPF ou de l'HPC dorsal.

L'ensemble de ces données pourrait aider à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'émergence des déficits de MDT et faciliter la prise en charge de patients durant le sevrage.

C. Principaux résultats obtenus

Plusieurs études ont montré que lors d'états dépressifs/anxieux, lors d'une dépendance à l'alcool et dans la MDT, ils existent des substrats cellulaires communs tels que le facteur de transcription CREB. Ainsi, nous avons choisi dans un premier chapitre, de déterminer si dans nos modèles, une modification de l'activité CREB joue un rôle dans l'émergence des troubles cognitifs induits par un sevrage à l'alcool ou un syndrome dépressif.

Les effets de l'alcoolisation (6 mois à 12%, groupe *Alcool*), d'un sevrage court (1 semaine, groupe *Sevré 1S*) ou prolongé (6 semaines, groupe *Sevré 6S*) sur la phosphorylation de CREB ont donc été étudiés dans deux structures cérébrales particulièrement affectées par le sevrage et la dépression et impliquées dans la MDT, le CPF et l'HPC. Les niveaux de CREB phosphorylé ont été mesurés dans les différents groupes expérimentaux en condition basale ou après l'exercice d'une tâche de MDT dans un test d'AS. Les mesures obtenues ont été comparées à celles des animaux *Contrôle* et *SCLI*. Outre pCREB, les niveaux d'acétylation des histones 3 et 4 ont également été quantifiés. En effet, comme énoncé dans l'introduction générale, les modifications épigénétiques ont été identifiées comme un mécanisme de l'action de l'alcool. L'objectif de cette analyse est de déterminer si l'alcool peut induire des altérations de l'acétylation des histones responsables de déficits d'expression de gènes pendant l'abstinence.

Ces premiers résultats ont montré que le sevrage et la procédure de SCLI induisent une perturbation de la MDT associée à un déficit de phosphorylation de CREB. En revanche, les souris toujours maintenues sous alcoolisation, ne présentent pas de troubles de la MDT ni d'altération de pCREB dans le CPF.

Au vu de ces éléments, une étude pharmacologique visant à rétablir l'activation/phosphorylation de CREB durant le test de MDT a également été réalisée à l'aide d'un inhibiteur de la PDE-IV, le rolipram, ou d'un activateur de la PKA, le Sp-cAMPS. Les résultats ont montré que la restauration de la phosphorylation de CREB dans le CPF suffit à améliorer les performances des souris *Sevré* démontrant ainsi la relation causale entre le déficit de phosphorylation de CREB et l'émergence des troubles de MDT induits par un sevrage.

Une partie des travaux présentés dans le chapitre 1 constitue une publication:
Dominguez G., Dagnas M., Decorte L., Vandesquille M., Belzung C., Béracochéa D. and Mons N. (2014) "Enhancing CREB function in the prefrontal cortex reverses working memory impairments induced by alcohol withdrawal in mice" *Brain Structure and Function*.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes attachés à déterminer l'impact de l'alcoolisation (*Alcool*) et d'un sevrage court (*Sevré 1S*) ou prolongé (*Sevré 6S*) sur le niveau d'anxiété et sur la réactivité de l'axe corticotrope aux niveaux plasmatique et central. Les groupes *Alcool* et *Sevré (1S/6S)* sont comparés à des souris *Contrôle* et aux souris *SCLI* modélisant la dépression afin de déterminer si les perturbations observées pendant le sevrage sont comparables à celles induites par un syndrome de type dépressif. Pour cela, les animaux ont dans un premier temps été soumis à des tests permettant de mesurer l'anxiété. La réactivité de l'axe corticotrope a été analysée grâce à la technique de microdialyse intracérébrale *in vivo*. La microdialyse a été réalisée en condition basale et durant l'exercice d'une tâche de MDT, le test d'AS, dans laquelle les animaux *Sevré (1S/6S)* et *SCLI* présentent d'importants déficits. L'avantage de cette technique est de pouvoir mesurer l'évolution de la corticostérone dans le CPF et l'HPC dorsal avec une grande précision locale et temporelle pendant que la souris réalise la tâche de MDT, tout en étant libre de ses mouvements. Les résultats ont permis de confirmer l'apparition de troubles anxieux au moment du sevrage ainsi que des troubles de l'axe corticotrope spécifiquement localisés dans le CPF mais non l'HPC au sein des groupes *Sevré* contrairement au groupe *SCLI*. Ces données nous ont permis de focaliser nos recherches ultérieures plus spécifiquement sur le CPF chez la souris sevrée.

Au vu des résultats des chapitres 1 et 2, nous avons cherché à comprendre ***le rôle de l'hyper réactivité de l'axe corticotrope dans le CPF dans l'émergence des déficits de MDT et de phosphorylation de CREB***. Ainsi dans un troisième chapitre, nous avons étudié les relations entre CREB et les GCs. Pour cela, nous avons examiné si la modulation pharmacologique des niveaux de pCREB modifie l'anxiété et les niveaux de corticostérone chez la souris sevrée et à l'inverse si l'augmentation ou la diminution des taux de corticostérone chez la souris « normale » (non alcoolisée) influe sur les niveaux de pCREB et les performances de MDT. Les résultats confirment que l'augmentation du niveau de corticostérone induit une perturbation de la MDT accompagnée d'un déficit de phosphorylation de CREB dans le CPF et dans une moindre mesure dans le CA1 dorsal au sein du groupe *Contrôle*. A l'inverse, la diminution du taux plasmatique de corticostérone par l'injection de métyrapone (inhibiteur de synthèse de la corticostérone) restaure les performances de MDT chez les groupes *Sevré* et *SCLI* ainsi que la phosphorylation de CREB dans le CPF et le CA1 dorsal. La contribution spécifique des récepteurs MR et GR a également été précisée dans l'émergence des déficits de MDT grâce à l'utilisation d'antagonistes spécifiques injectés directement dans le CPF ou l'HPC dorsal chez les souris *Sevré 1S*.

Une partie des résultats des *chapitres 2 et 3* de ce manuscrit fait l'objet d'un article en soumission : Dominguez G., Henkous N., Decorte L., Pierard C., Belzung C., Mons N. and Beracochea D. " *Exaggerated corticosterone rise in the prefrontal cortex of alcohol-withdrawn mice*

*induces long-lasting alterations of CREB phosphorylation and working memory deficits”
Neuropsychopharmacology, submitted*

Les résultats des chapitres précédents font apparaitre plusieurs acteurs principaux dans l'émergence des troubles anxieux et cognitifs associés au sevrage à l'alcool. En effet, l'action des GCs sur pCREB et le rôle spécifique et central du CPF ont été mis en lumière dans les premiers chapitres. Ainsi, dans une dernière partie, nous avons cherché à déterminer si le traitement médicamenteux de première intention du syndrome de sevrage alcoolique permet de réduire l'hyperactivité de l'axe corticotrope dans le CPF, ainsi que l'émergence des troubles de phosphorylation de CREB dans le CPF, responsable des déficits de MDT. Dans ce but, les souris ont été traitées avec du diazépam de façon chronique puis l'effet du diazépam a été mesuré sur le niveau d'anxiété 1 semaine après le sevrage des souris. Nous avons également cherché à déterminer si le diazépam pouvait restaurer la réactivité de l'axe corticotrope dans le CPF des souris sevrées pendant l'exercice d'une tâche de MDT et la phosphorylation de CREB dans le CPF et le CA1 dorsal 1 jour ou 5 semaines après le fin du traitement.

Les résultats du chapitre 4 de ce manuscrit font l'objet d'un article en préparation.

Matériels et Méthodes

A. Animaux et procédures comportementales

1. Animaux

Les soins ainsi que les expérimentations réalisées sur les animaux sont en conformité avec la directive du conseil de la Communauté Européenne se rapportant à l'utilisation des animaux de laboratoire à des fins expérimentales (directive n° 86/609ECC).

a. La lignée

Les expériences ont été réalisées avec la lignée consanguine de souris C57BL6/J (Centre d'élevage Charles River, France). Cette lignée a été choisie en raison de sa forte appétence pour l'alcool (Belknap et al., 1993, Meliska et al., 1995, Bachmanov et al., 1996, Misra and Pandey, 2003). De plus, elle est fréquemment utilisée dans les études de la mémoire.

b. Conditions d'élevage

Les souris sont réceptionnées par lots homogènes de 15-20 sujets âgés de 8 semaines. A leur arrivée au laboratoire, les animaux sont placés en stabulation en cage collective de type 4 (surface de 720cm²) avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. La température et l'hygrométrie de la pièce d'animalerie sont contrôlées (21±1°C et 55±10, respectivement) et un cycle nyctéméral de 12h est appliqué dans l'enceinte (jour à 7h). Les souris sont maintenues en cages collectives pendant toute la période d'alcoolisation. Dix jours avant le début des expériences, les souris sont isolées en cages individuelles (surface de 180cm²) avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Trois jours après avoir été isolés, les animaux sont manipulés et pesés quotidiennement pendant une semaine.

2. Modèles expérimentaux

a. Procédure d'alcoolisation chronique

A partir de 4 mois d'âge, les souris alcoolisées reçoivent comme unique boisson une solution d'éthanol à 12 % (réalisée à partir d'alcool 95% (Prochilab). La concentration d'éthanol est progressivement augmentée pendant 3 semaines consécutives par palier de 4% puis maintenue à 12% pendant 6 mois. Au terme du traitement, les souris alcoolisées sont progressivement sevrées pendant 10 jours consécutifs en diminuant le degré d'alcool par palier de 4% jusqu'à l'eau. Les souris sont ensuite soumises aux épreuves comportementales 1 semaine (*Sevré 1S*) ou 6 semaines (*Sevré 6S*) après

le sevrage. Les souris du groupe *Alcool* ont été maintenues sous alcoolisation pendant toutes les épreuves. Le groupe *Contrôle* a reçu pour boisson l'eau du laboratoire.

b. Procédure de stress chronique léger imprédictible

Ce modèle de dépression consiste à exposer chroniquement les animaux pendant 6 semaines consécutives à divers stressseurs socio-environnementaux, selon un protocole prédéterminé (**Tableau 2**). Chaque stress étant d'intensité faible, aucun d'entre eux n'est suffisant pour induire des perturbations profondes et persistantes. La distribution des stressseurs est hétérogène dans le but de donner un caractère imprédictible à l'exposition au stress et d'éviter ainsi tout phénomène d'habituation. Pour des raisons éthiques, tout stress nociceptif a été exclu ainsi que les privations d'eau et de nourriture car il s'agit de stressseurs sévères et inutiles.

Différents stressseurs sont utilisés, chacun d'eux pouvant être associé à un autre pour moduler l'intensité du stress :

- changements répétés de litière (jusqu'à 3 changements/24h),
- stress social (chaque individu est déposé dans une cage préalablement occupée par un autre individu puis réintègre sa cage initiale au bout de quelques heures ou par le dépôt de litière souillée provenant d'un autre animal),
- cages sans litière (1 à 6 h),
- litière humide (1 à 3h),
- cages penchées à 45° (2h),
- fèces de rats (la litière de rat contenant leurs fèces est déposée dans la cage de l'animal pendant 1 à 2h),
- cris de prédateurs (diffusion d'enregistrements de cris de rapaces, 10min),
- « bain » (on remplace la litière par 1cm d'eau à 20°C dans la cage pendant 15 à 30min),
- stress de contention (les animaux sont maintenus dans un tube fermé et aéré pendant 30 à 60 min, les animaux ont la possibilité de se retourner dans le tube),
- inversions de cycle jour/nuit, période d'illumination d'une à deux heures durant la phase obscure et inversement.

	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
1	Etat du pelage et peser (10h) Stress social (12h) Retrait de la sciure (15h-17h)	Stress social (9h) Confinement (15h-16h)	3 changements de sciure (10h30-11h30) Stress social (15h)	Stress social (12h) Sciure mouillée (14h-15h30)	Cages inclinées à 45° (9h30-11h) Stress social (14h)	Inversion du cycle jour/ nuit (après 8h)	Inversion du cycle jour/ nuit
2	Reprise du cycle (8h) Etat du pelage et peser (10h) Confinement (12h-13h) Cages inclinées (14h-15h30)	Retrait de la sciure (9h-12h) stress social (11h) Cages inclinées (15h-16h30)	2 changements de sciure (10h-11h) Stress social (18h)	Stress social (12h) Confinement (15h-17h) Lumière (20h-21h)	Noir (8h-9h) Sciure mouillée (10h-13h) Stress social (15h)	4 successions de lumière/ nuit toutes les 30 min (9h30-11h30) Noir (15h-17h) Lumière (4h-6h)	4 successions de lumière/ nuit toutes les 30 min (9h30-11h30) Noir (15h-17h) Lumière (4h-6h)
3	Etat du pelage et peser (10h) Retrait de la sciure (15h-16h30)	Cages inclinées à 45° + retrait de la sciure (11h-14h) Bain (15min) (15h)	Confinement (8h-10h) Stress social (14h30 et 17h30)	Sciure mouillée (8h30-11h30) et stress social (10h) Crotte de rat (14h-15h) Lumière (17h-18h)	Noir (9h-9h30) Changement de sciure (10h) Retrait de la litière (14h30-17h30) Inversion du cycle (20h)	Inversion du cycle jour/ nuit	Inversion du cycle jour/ nuit Fin d'inversion (20h)
4	Etat du pelage et peser (10h) Sciure mouillée (15h-18h) + Stress social (16h30)	Confinement (11h-12h) Cages inclinées à 45° (14h-15h et 17h-18h)	Stress social (9h et 12h) Changement de sciure (16h) Lumière (30min) (3h-4h30-6h)	Stress social (9h et 9h30) Sciure mouillée (14h30-17h30)	3 changements de sciure (10h-11h) Bain (15min) (14h30)	Lumière (9h-11h) Inversion du cycle jour/ nuit après 20h	Fin de l'inversion du cycle (8h) Noir 30 min (15h-16h-17h-18h-19h)
5	Etat du pelage et peser (10h) Sciure mouillée (14h30-18h30)	Cages inclinées à 45° (10h-13h) Stress social (15h) Lumière (30min) à (4h-5h-6h)	Confinement (8h-9h) Confinement (10h-11h) Retrait de sciure (16h-17h30)	Crotte de rat (10h-11h) Retrait de la sciure (14h30-10h) Stress social (16h et 18h) Lumière (5h-6h)	Stress social (9h) Bain (15min) (10h) 2 changements de sciure (15h-16h)	4 successions de lumière/ nuit toutes les 30 min (9h30-11h30) Noir (15h-17h) Lumière (4h-6h)	4 successions de lumière/ nuit toutes les 30 min (9h30-11h30) Noir (15h-17h) Lumière (4h-6h)
6	Etat du pelage et peser (10h) Bruit de rapace (16h-16h20)	Confinement (10h-11h) Retrait de la sciure + Cages inclinées à 45° (16h-18h30)	Stress social (11h et 13h) Bain (15 min) (15h)	Sciure mouillée (10h-13h) 2 changements de sciure (15h30-16h30)	Cages inclinées à 45° (9h30-11h30) et Stress social (10h30) Stress social (18h30)		

Tableau 2 : protocole de stress chronique léger imprédictible sur 6 semaines

Mesure de l'état physique. Chaque semaine l'état du pelage et le poids des animaux sont évalués. L'état du pelage résulte de la fréquence et de la qualité du comportement de toilettage, cette mesure détermine la motivation de l'animal à des activités autocentrées. Cette évaluation consiste à scorer l'état de la fourrure (lisse et nette *versus* hérissée, présence d'épis) en attribuant une note (de 0 / 0.5 / à 1) à sept parties distinctes du corps de l'animal (tête, cou, dos, ventre, queue, pattes avant, pattes arrière) (Santarelli et al., 2003). A cette occasion, les animaux sont pesés afin de compléter l'examen et contrôler leur état général. La mesure de l'état du pelage est réalisée au moins 24 heures après l'application du dernier stresser afin de ne pas biaiser les résultats car la litière humide, le confinement ou le « bain » peuvent induire temporairement une altération de l'état du pelage.

3. Modèles comportementaux

a. L'alternance spontanée

Choix du test comportemental

Le test d'alternance spontanée (AS) dans le labyrinthe en T permet l'étude de la MDT spatiale des rongeurs en évitant l'effet de la privation alimentaire et du renforcement. De plus, du fait de sa sensibilité à l'effet du délai et des interférences, l'AS réalisée avec une procédure séquentielle (plusieurs essais successifs séparés par un délai court) se révèle être un test particulièrement adapté à l'étude de la MDT.

Appareil

Le labyrinthe en T (**Fig. 21**) est situé dans une pièce à luminosité constante (30lux), dont les murs portent divers indices visuels (papiers contrastés et hachurés) positionnés un mètre au-dessus du labyrinthe. Conçu en Plexiglas opaque, le labyrinthe en T est constitué d'un compartiment de départ, d'une allée centrale et de deux compartiments d'arrivée opposés. Le compartiment de départ (14x10x20) ainsi que ceux d'arrivée (29x10x20) sont séparés de l'allée centrale (46x10x20) par des portes coulissantes qui peuvent être actionnées à distance par un système de vérins. Les déplacements de l'animal sont visualisés grâce à une caméra située au-dessus du labyrinthe.

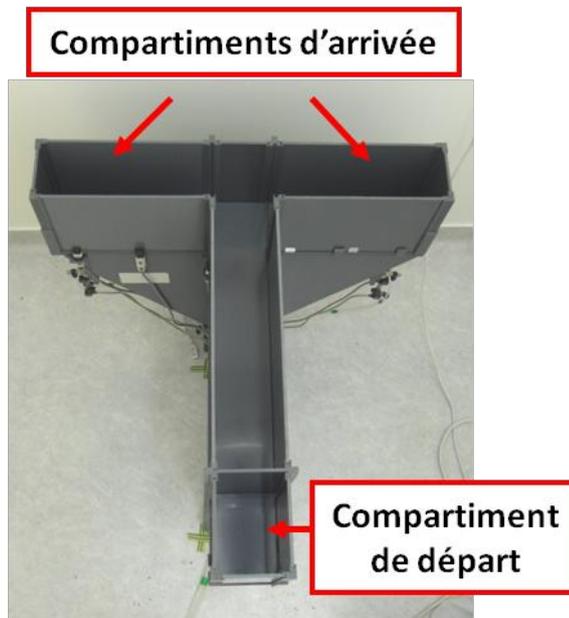


Figure 21 : labyrinthe en T.

L'appareil se compose d'un compartiment de départ et de deux compartiments d'arrivée séparés par une allée centrale.

Procédure comportementale

Habituation : (jour 1 et 2) les souris sont tout d'abord soumises à deux sessions d'habituation de 10 minutes chacune (1 session par jour), permettant à la souris d'explorer librement l'appareil, de se familiariser avec les indices visuels et le labyrinthe en T.

Session pré-test : (jour 3) les souris sont soumises à une première session d'alternance séquentielle spontanée ayant pour but d'habituer l'animal à la procédure expérimentale (confinement, ouverture/fermeture des portes, manipulation par l'expérimentateur), de s'assurer de la mise en place du comportement d'AS ainsi que de réduire le stress et la néophobie. La session est composée de 7 essais séparés de 30 secondes.

Session test : (jour 4) les animaux réalisent le test comportemental d'AS permettant l'étude de la MDT. L'animal est confiné dans le bras de départ pendant un délai prédéfini de 90 secondes (intervalle entre essais ou IEE). A la fin de ce délai, la porte du compartiment de départ est abaissée et l'animal peut entrer librement dans l'un des deux bras de l'appareil. Une fois l'animal complètement entré dans l'un des deux bras d'arrivée, une porte se referme, confinant ainsi l'animal dans le bras choisi pendant trente secondes, délai permettant le repérage spatial de l'animal. Le délai de confinement dans le bras d'arrivée est toujours de 30 secondes. La souris est ensuite replacée dans le compartiment de départ pour un nouvel essai. Au cours de la session composée de 7 essais, l'animal a le choix d'entrer librement dans un des deux bras.

De plus, afin de dissocier un déficit de la MDT, d'une éventuelle diminution progressive de la motivation à alterner au cours de la série, un 8ème essai avec un IEE court de 5 secondes, a été ajouté à la fin de la série de 7 essais.

Paramètre de l'expérience

Une série de test est constituée de sept essais successifs durant lesquels les latences de choix du bras sont enregistrées, ce qui permet de définir la latence de choix moyenne, ainsi que le nombre d'alternance totale d'où découle le pourcentage d'alternance (nombre d'alternances/nombre d'essais x100). Le pourcentage d'alternance est utilisé comme index de la MDT.

De plus, afin de mesurer l'effet des interférences proactives, c'est-à-dire à l'interférence provoquée par les premiers essais sur les suivants, le calcul du pourcentage d'alternance par bloc d'essais a été réalisé (bloc A= essais 2, 3 et 4 ; bloc B= essais 5, 6 et 7). Cette analyse a pour but de visualiser l'effet des interférences qui se manifeste par une diminution progressive des performances au fur et à mesure des essais. L'essai 1 étant un choix libre non influencé par un essai précédent, il n'est pas inclus dans les analyses.

b. Le labyrinthe en croix surélevé

Principe général

Ce test permet l'étude de la réactivité émotionnelle en analysant le comportement exploratoire des rongeurs placés dans des situations qui exploitent leur aversion spontanée envers la lumière, les espaces ouverts et le vide. L'analyse des indices comportementaux dans ce type d'épreuve permet de mesurer des signes d'augmentation ou de diminution de l'anxiété chez le rongeur. De plus, ce test est rapide et ne nécessite aucun apprentissage de la part de l'animal.

Cette épreuve a été mise au point par Montgomery (1955) et repose sur l'aversion naturelle des rongeurs face aux espaces ouverts et élevés. Lister (1987) a validé la procédure en tant que modèle d'anxiété chez la souris en démontrant que les animaux visitent plus fréquemment et plus longtemps les bras fermés que les bras ouverts. De plus, les visites dans les bras ouverts s'accompagnent de manifestations émotionnelles telles que l'immobilisation, la défécation, la miction, l'aplatissement etc., mais aussi d'une augmentation plus importante de la concentration plasmatique de corticostérone que dans les bras fermés. Ces auteurs ont également montré que l'aversion pour les espaces ouverts est respectivement diminuée et accrue par les composés anxiolytiques et anxiogènes.

Au cours de ce test nous sommes intéressés aux paramètres comportementaux reflétant « l'anxiété » des animaux :

- **index de temps**= (temps passé dans les bras ouverts / temps total de visites des bras)*100

- **index de distance**= (distance parcourue dans les bras ouverts / distance total parcourue)*100

Plus ces index sont faibles, plus l'animal est considéré comme « anxieux »

La distance totale parcourue a également été mesurée afin de déterminer l'activité locomotrice.

Appareil

L'appareil est un labyrinthe en forme de croix, en Plexiglas gris (**Fig. 22**). De la plateforme centrale (7 x 7 cm) partent quatre bras (30 x 7 cm), dont deux sont limités par des parois verticales d'une hauteur de 17 cm (bras fermés) alors que les deux autres bras en sont dépourvus (bras ouverts). L'appareil est surélevé de 55 cm et éclairé (100 lux). Les animaux sont placés dans l'appareil pendant 6 minutes et leurs comportements sont enregistrés.

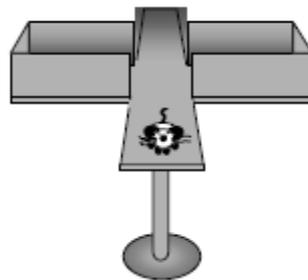


Figure 22 : labyrinthe en croix surélevé.

c. Test d'exploration d'une planche à 9 trous

Principe général

Ce test permet d'évaluer le comportement exploratoire des souris en se basant sur le conflit entre les réactions de néophobie et la curiosité des animaux. Dans ce test, la curiosité pousse l'animal à explorer les trous alors que l'anxiété l'en dissuade. Durant le test, l'animal est libre d'explorer l'appareil pendant une durée de 10 minutes au cours desquelles ces déplacements sont observés sur un écran vidéo et enregistrés depuis la pièce adjacente. Le bruit de fond et l'éclairage (20 lux) de la pièce sont maintenus constants. Au début du test, l'animal est placé au centre de l'appareil pendant 5 secondes, dans un cylindre de Plexiglas opaque (16 cm de hauteur et 13 cm de diamètre) afin de permettre l'orientation aléatoire du départ. La boîte à 9 trous est soigneusement nettoyée à l'alcool à 95% puis à l'eau entre chaque souris.

Appareil

La boîte à 9 trous est une enceinte carrée en Plexiglas gris opaque, de 45 cm de côté et de 30 cm de hauteur. Le plancher de l'appareil est percé de huit trous de 3 cm de diamètre, situés à une distance de 6 cm des parois et d'un trou central. Des cellules photoélectriques placées au fond de

chaque trou reliées à un ordinateur situé dans la pièce adjacente permettent de mesurer différents paramètres :

- temps total de visite des 9 trous (secondes)
- nombre de visite des 9 trous
- fréquence totale de visite des 9 trous
- temps d'exploration par bloc (Bloc A=5 premières minutes et au Bloc B= 5 dernières minutes)

4. Chirurgie stéréotaxique

a. Procédure générale

Les animaux sont anesthésiés avec une injection intrapéritonéale (ip) d'un mélange de kétamine et de xylazine (Ketamine 1000 Vibrac[®] : 100mg/kg ; Rompun[®] 2% : 8mg/kg). Les souris sont ensuite positionnées sur l'appareil stéréotaxique (La précision Cinématographique, LPC) par deux barres d'oreille et une barre de mâchoire. Les yeux de l'animal sont protégés de la lumière et de la déshydratation par un gel protecteur oculaire (Ocry-gel[®]). La peau du crâne est désinfectée par badigeonnage avec une solution antiseptique (Bétadine[®] Dermique 10%), puis imprégnée d'une solution de lidocaïne HCl (Xylocaine[®], 5%) avant de procéder à l'incision.

La prise de coordonnées stéréotaxiques d'implantation permet de noter à l'aide d'un marqueur chirurgical l'emplacement des guides sondes (CMA/7 Microdialysis probe, CMA Microdialysis, Sweden) ou des guides canules (acier chirurgical ; longueur = 8mm ; Ø ext. = 0.46mm, Ø int. = 0.255 mm ; le Guellec tubular components) en se rapportant aux coordonnées du bregma selon l'atlas de Paxinos et Franklin 2001. Une fois l'emplacement des guides notés, le crâne est recouvert de cyanolit[®], une colle non toxique. Le crâne de l'animal est ensuite trépané afin de placer les guides au dessus du CPF ou de l'HPC dorsal. Une fois les guides positionnés, du ciment dentaire (PalavitG[®], Promodentaire) est utilisé pour maintenir les guides sur la tête de l'animal en adhérant à la cyanolit[®]. Afin d'éviter le bouchage des guides et l'entrée de poussières, des mandrins en acier inoxydable sont insérés. Les animaux sont replacés dans leur cage d'animalerie et déposés à proximité d'une source de chaleur jusqu'à leur réveil. Après la chirurgie, les souris disposent au minimum de 15 jours de récupération avant d'être soumises au protocole comportemental. Pendant cette semaine, les souris sont pesées et manipulées quotidiennement afin de déceler tout incident.

b. Injections intracérébrales

Après la phase de récupération, les animaux sont manipulés trois fois par l'expérimentateur afin de les habituer à la contention ainsi qu'à l'insertion des canules (\emptyset ext. = 0,23 mm ; longueur = 9 mm). Ces dernières sont placées et laissées en place 1 minute, et ce trois fois au cours de la semaine qui précède le test, pour habituer les souris à cette manipulation.

Le jour du test d'AS, les canules reliées par des cathéters de polyéthylène à des seringues Hamilton (1 μ l) sont insérées bilatéralement dans chaque guide canule, dont elles dépassent de 1 mm en profondeur afin que la pointe de la canule soit située dans le CPF ou l'HPC dorsal. Après l'injection, les canules sont laissées à demeure 2 minutes afin de favoriser la diffusion tissulaire et d'éviter la remontée du produit dans le guide. Les mandrins sont ensuite replacés dans les guides et les animaux sont soumis à l'épreuve de MDT, 15 minutes après le retrait des canules d'injection. Les injections sont réalisées dans une pièce différente de celle du comportement.

	Cortex préfrontal	Hippocampe dorsal
Débit (μ l/min)	0.1	0.2
Volume (μ l)	0.25	0.5

Tableau 3 : débit et volume injecté dans le cortex préfrontal et l'hippocampe dorsal au cours d'une procédure d'injection in situ.

c. Contrôles histologiques

Afin de vérifier la localisation des sites d'injection ou de dialyse, le cerveau de chaque souris est prélevé à la fin des tests expérimentaux en vue du contrôle histologique. Pour cela, les animaux sont anesthésiés par une injection ip de pentobarbital (10 ml/kg), puis perfusés en intracardiaque avec 100 ml d'une solution de formol à 10% dans du tampon phosphate (PB 0.1M, pH=7.4, 4°C). Les cerveaux sont ensuite prélevés et post-fixés pendant 48h, avant de passer dans une solution formol 10% / saccharose 30% pendant 24h minimum. Cette solution permet d'extraire l'eau des cerveaux par phénomène d'osmolarité, afin que la congélation n'endommage pas les tissus. Les cerveaux sont coupés frontalement (50 μ m) au microtome à congélation, montés sur lames gélatinées, puis colorés à la thionine (colorant cytoplasmique). Après montage d'une lamelle, les coupes de contrôle histologique sont visualisées au microscope optique afin d'identifier le site d'implantation, ce qui permet le cas échéant, d'éliminer les animaux implantés hors de la structure ciblée.

B. Approches moléculaires

1. Immunohistochimie

a. Procédure générale

Après la fin du test comportemental dans le labyrinthe en T, les animaux sont anesthésiés par une injection ip d'avertine (10ml/kg) puis sont sacrifiés par perfusion intracardiaque de paraformaldehyde (PFA, 100ml à 4% dans du tampon phosphate (PB) 0.1M, pH 7.4, 4°C). Les cerveaux sont ensuite prélevés et post fixés une nuit à 4°C dans le même fixateur. Le lendemain, des coupes frontales sériées de 50µm sont réalisées au vibratome et maintenues à -20°C dans une solution de glycérol. L'immunomarquage est ensuite réalisé sur coupes flottantes. Les étapes décrites ci-après sont effectuées sous agitation douce. Les rinçages (15 minutes) sont effectués dans des puits de boîte de culture contenant 5 ml de solution tampon. Après 4 rinçages, les coupes sont incubées dans une solution d'H₂O₂ (0.5%) pendant 10 minutes afin d'inhiber l'activité des peroxydases endogène. Quatre rinçages sont appliqués avant d'incuber les coupes dans une solution de saturation pendant 2h à 4°C (tampon 0.1M ; albumine sérique bovine 1% ; sérum de chèvre 3% ; Triton X-100 0.2%), puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation. Après 4 nouveaux rinçages, les coupes sont mises en présence de l'anticorps secondaire (IgG de chèvre anti-lapin, 1 :2000, Jackson Immunoresearch®) dilué dans la solution tampon pendant 2h à température ambiante. Après quatre rinçages, les coupes sont incubées avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories®) pendant 2h à l'obscurité et à température ambiante, puis rincées à nouveau 4 fois avant de procéder à la révélation du complexe antigène-anticorps à l'aide de 2-3 diaminobenzidine (DAB ; 0.05%) peroxydée en présence d'H₂O₂ (0.02%). Cette réaction produit un précipité brun révélant la protéine d'intérêt et est stoppée après 10-15 minutes par 4 rinçages au tampon à 4°C. Les coupes sont ensuite montées sur lames, déshydratées dans deux bains successifs de toluène puis recouvertes d'une lamelle à l'aide d'une résine (Eukitt®).

Marquage de pCREB

Pour réaliser le marquage pCREB, les animaux ont été sacrifiés 30 minutes après le début du test d'AS afin de révéler les changements de phosphorylation de la protéine CREB liés au test de MDT. L'immunohistochimie est réalisée avec du tampon Tris (0.1M, pH7.4) et toutes les solutions utilisées pour l'immunohistochimie contiennent un inhibiteur de phosphatase (Sodium fluoride,

2.1g/l). Le marquage spécifique de pCREB est réalisé par une incubation de 48h à 4°C avec l'anticorps primaire anti-pCREB (1:6000, Millipore, Billerica, MA, USA) produit chez le lapin.

Marquage de H4 acétylée

L'immunohistochimie anti-H4 acétylée a été réalisée sur les mêmes souris, sacrifiées 30 minutes après le début du test. Cette immunohistochimie a pour but de déterminer les modifications d'acétylation des résidus lysines de l'histone H4 liées à l'alcoolisation chronique, au sevrage, au stress chronique et au test de mémoire d'AS. Pour cela, les coupes sont incubées 48h à 4°C avec l'anticorps primaire anti-acétyl (Lys 5, 8, 12, 16) histone 4 (Upstate Biotechnology), dilué au 1/4000.

Marquage de H3 acétylée

L'immunohistochimie anti-H3 acétylée a été réalisée sur les mêmes souris et permet de déterminer les modifications d'acétylation des résidus lysines de l'histone H3 liées à l'alcoolisation chronique, au sevrage, au stress chronique et au test de mémoire d'AS. L'anticorps primaire anti-acétyl (Lys 9) histone 3 (Epitomics) a été dilué au 1/6000 avant d'incuber les coupes pendant 48h à 4°C.

b. Quantification

La quantification du marquage s'effectue en aveugle à l'aide d'un système d'imagerie semi-automatisé (OLYMPUS BX 50[®], Biocom Visiolab 2000[®], V4.50). Pour chaque individu et chaque structure, le comptage est effectué sur 4 à 6 coupes de façon bilatérales, puis moyenné en nombre de noyaux immunopositifs par mm². Les structures analysées sont le CPF (zone prélimbique et infralimbique moyennées) et le CA1 dorsal et ventral selon les coordonnées de l'atlas de Paxinos et Franklin (2004) (**Fig. 23**). Ces régions cérébrales ont été choisies pour leurs implications dans la MDT spatiale.

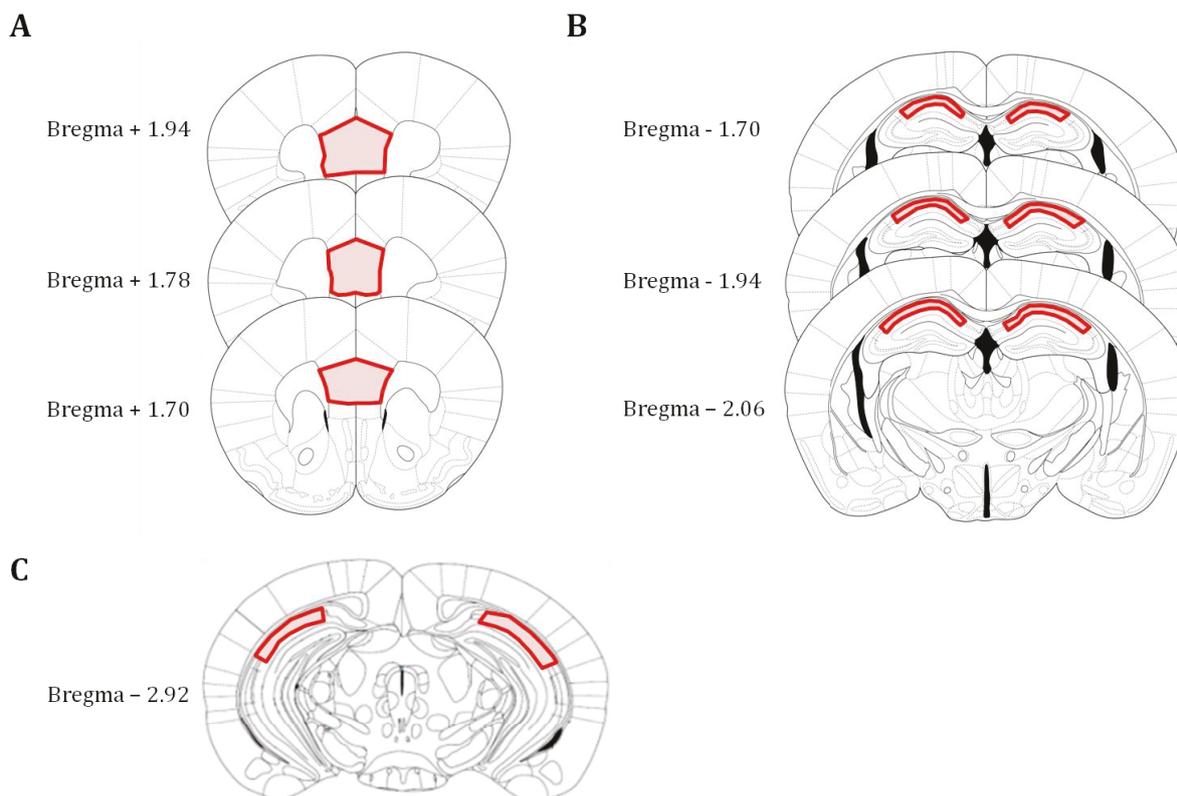


Figure 23 : illustrations des zones cérébrales quantifiées. La quantification est réalisée dans le CPF (A), le CA1 dorsal (B) et le CA1 ventral (C) d'après l'atlas de Paxinos et Franklin (2004).

2. Activation de la voie PKA/CREB

a. Choix de l'activateur

Rolipram

Le Rolipram (Tocris bioscience) est un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase de type 4 (PDE-IV), il est utilisé afin d'augmenter la phosphorylation de CREB. Une étude préliminaire a été réalisée avec deux doses (0.03 mg/kg et 0.1 mg/kg) afin de déterminer la dose efficace (annexe 3). La dose utilisée dans notre étude (0.1 mg/kg) a été choisie en fonction des données de préliminaires et de la littérature (Imanishi et al., 1997, Reneerkens et al., 2009).

La solution de Rolipram est préparée avant chaque expérience (pH=7). Pour cela, le rolipram est dissous dans du DMSO (1% final) puis dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0.9% Baxter®). Les animaux sont injectés par voie ip, 30 minutes avant le test avec un volume de 10 ml/kg. Les injections sont réalisées dans une pièce différente de celle du comportement.

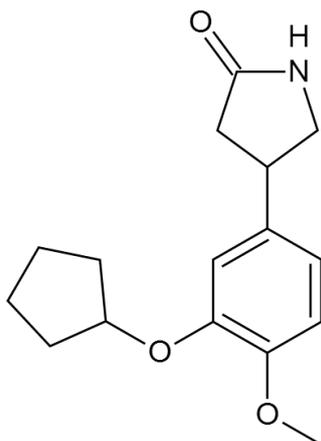


Figure 24 : structure moléculaire du rolipram

Sp-cAMPS

Le Sp-cAMPS (Tocris bioscience) est un puissant activateur spécifique de la PKA, il permet d'augmenter la phosphorylation de CREB et les mécanismes cellulaires sous jacents. La solution est préparée à partir de liquide céphalorachidien artificiel (LCRa ou ACSF) (Microperfusion fluid, Phymep®) avant chaque expérience (PH=7). Afin de déterminer la concentration efficace (Annexe 4), trois doses ont été testées (21 nmol, 2.1 nmol et 0.21 nmol) sur la base de travaux précédents (Taylor et al., 1999, Runyan and Dash, 2005). La dose la plus efficace utilisée pour les expériences décrites dans ce manuscrit est la dose de 2.1 nmol.

C. Etude neurobiologique de l'axe corticotrope

1. Dosage de la corticostérone

a. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés entre 9h et 12h afin de limiter les effets du cycle circadien de la corticostérone endogène sur les dosages. Environ 100µl de sang sont prélevés au niveau sous mandibulaire, dans un tube eppendorf hépariné afin d'éviter la coagulation. Les tubes sont stockés dans de la glace avant d'être centrifugés pendant 10 minutes (3000 tours/minute à 4°C). Le surnageant est ensuite récupéré dans un nouveau tube eppendorf puis conservé à -80°C jusqu'au dosage.

b. Microdialyse

La microdialyse permet d'échantillonner le liquide céphalorachidien et le prélèvement de molécules, afin être dosées. La technique de microdialyse repose sur le principe de diffusion passive de molécules en fonction de leurs gradients de concentration et de leurs poids moléculaires au travers d'une membrane semi-perméable. Cette membrane forme la chambre de dialyse et comporte des pores de diamètre connu définissant un seuil d'exclusion des molécules en fonction de leurs poids moléculaires (cut-off). La composition du dialysat reflète donc celle du liquide céphalorachidien mais n'en est pas une photographie exacte. Pour la plupart des substances, l'équilibre entre le dialysat et le liquide interstitiel est incomplet. La concentration dans le dialysat dépend de la vitesse de perfusion, du diamètre des pores de la membrane, de la taille de la molécule et de ses caractéristiques physiques. Le rendement des échanges à travers la membrane pour une substance donnée définit le rendement relatif et correspond au rapport de la concentration dans le dialysat sur la concentration extracellulaire réelle.

Dans notre cas, le dialysat est récolté afin de doser la corticostérone au cours du temps avant, durant et après un test d'AS. Pour cela, un guide sonde est implanté dans l'HPC dorsal ou dans le CPF comme expliqué précédemment (voir matériel et méthode, chirurgie stéréotaxique), puis la sonde est insérée dans la structure cible, la veille du jour de la dialyse. La sonde de microdialyse (CMA7, CMA Microdialysis AB[®], Suède, cut-off 6KDa) est constituée d'un cathéter d'entrée dans lequel circule à débit constant (1µl/min) du LCRa (solution tampon phosphate Dulbecco, composition en g/L : CaCl₂, 0,133; MgCl₂, 0,1; KCl, 0,2; KH₂PO₄, 0,2; NaCl 8,0; Na₂HPO₄, 1,15; pH entre 7,1- 7,5 ; Sigma,

France) et d'une membrane semi-perméable (\varnothing ext. : 0.24mm) où s'effectue la diffusion du milieu le plus concentré (cerveau) vers le milieu le moins concentré (chambre de dialyse). À la sortie de la chambre de dialyse, le dialysat chargé en molécule est ensuite acheminé vers le collecteur réfrigéré à 4°C.

La veille de l'expérience, la sonde de dialyse perfusée à un débit de 0.5 μ l/minute est insérée dans le guide et les animaux sont placés dans l'enceinte de microdialyse ($\varnothing=40$ cm, hauteur=36cm ; CMA/120 ; CMA microdialysis, Suède) contenant de la litière propre, de l'eau et de la nourriture *ad libitum* afin de permettre aux animaux de s'habituer à ce nouvel environnement. A 7 heures, le lendemain matin, le débit de perfusion est réglé à 1 μ l/min. Après une période stabilisation de 2 heures, les prélèvements en condition basale (4 prélèvements de 15 μ l toutes les 15 minutes) sont réalisés pendant une heure. Le test d'alternance en T est ensuite réalisé pendant que l'animal est microdialysé grâce à l'utilisation d'une potence située au dessus du labyrinthe permettant aux animaux de se déplacer librement dans le labyrinthe (**Fig. 25**). Les dialysats sont prélevés toutes les 15 minutes durant deux heures après le début du test (soit 8 prélèvements de 15 μ l). A la fin du recueil, les dialysats sont stockés à -80°C, en attente du dosage de la corticostérone par kit ELISA.



Figure 25 : Dispositif de microdialyse adapté pour la réalisation du test d'AS dans le labyrinthe en T. Le dispositif de microdialyse se compose d'une enceinte (dans laquelle la souris peut se déplacer librement avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*), d'un pousse seringue, d'un collecteur et d'une potence équipée d'un pivot. La potence étant mobile, elle permet le déplacement de la souris dans le labyrinthe en T.

c. Dosage ELISA

Le dosage de la corticostérone présente dans les échantillons est réalisé par kit ELISA (Enzym linked Immuno Sorbent Assay). Le principe du kit ELISA est une réaction immunologique permettant de révéler la présence d'une protéine particulière. L'anticorps est couplé à une enzyme qui, en présence du bon substrat, produit un composé coloré dont la densité optique sera mesurée à la longueur d'onde de 450nm.

Les échantillons de plasma sont soit traités avec un agent de dissociation permettant de dissocier la corticostérone de sa protéine de transport (dosage de la corticostérone totale) soit non traités (dosage de la corticostérone libre uniquement). L'échantillon subit une dilution finale de 1/100. Pour les échantillons de LCR, une dilution au 1/3 est réalisée dans du tampon, en revanche l'étape de dissociation n'est pas nécessaire car la corticostérone est déjà sous forme libre après son passage de la barrière hémato-encéphalique. Afin de déterminer la concentration en corticostérone dans les échantillons, une gamme standard de concentrations connues de corticostérone est réalisée et déposée sur la même plaque.

Les mesures de densité optique sont obtenues grâce à la lecture de la plaque 96 puits à 450nm (VICTOR[®], Pekin-Elmer). La courbe-étalon réalisée à l'aide de la gamme standard permet le calcul de la concentration de corticostérone contenue dans les échantillons.

2. Modulations pharmacologiques de l'axe corticotrope

a. Corticostérone

Afin de simuler l'effet d'un stress sur les performances de MDT, de la corticostérone (Sigma, France) a été injectée en ip à une concentration de 2 mg/kg. La corticostérone a été diluée dans une solution physiologique (NaCl 0,9%) et de DMSO (5% final). Ce composé est ensuite injecté chez la souris à un volume de 10ml/kg, 30 minutes avant le début du test.

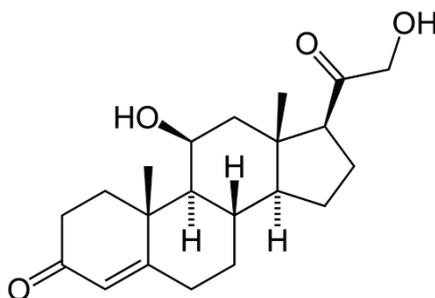


Figure 26 : structure moléculaire de la corticostérone

b. Metyrapone

Afin de s'assurer de l'implication de la corticostérone dans les effets du stress associés au sevrage ou au protocole de SCLI sur la MDT et pCREB, nous avons injecté de la metyrapone (35 mg/kg en ip, référence 3292, Tocris). La metyrapone inhibe la synthèse de corticostérone via l'inhibition de la 11- β -hydroxylase. La metyrapone est dissoute dans du DMSO (5% final) puis dans une solution physiologique (NaCl 0,9%). La solution est injectée chez la souris (10ml/kg), 30 minutes avant le début du test.

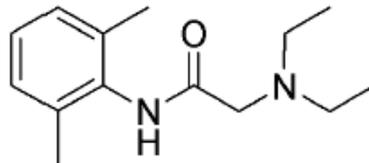


Figure 27 : structure moléculaire de la métyrapone

c. Mifépristone et Spironolactone

Afin de déterminer l'implication des récepteurs MR et/ou GR, nous avons injecté in situ dans le CPF et l'HPC dorsal soit un antagoniste des GR, le mifépristone (RU 28318, à une concentration de 2ng/ml, Tocris) soit un antagoniste des MR, le spironolactone (RU 38486, à une concentration de 2ng/ml, Tocris). La mifépristone et le spironolactone sont des antagonistes compétitifs qui empêchent la fixation de la corticostérone, le ligand naturel, sur les récepteurs. Les antagonistes ont été dilués dans du DMSO (5% final) et dans du LCRa (LCR, Microperfusion fluid, Phymep®) avant chaque expérience (PH=7). Les antagonistes sont injectés 15 minutes avant le début du test.

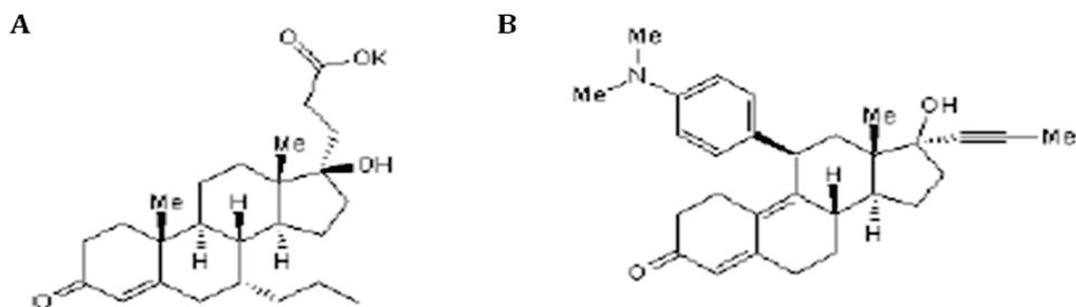


Figure 28 : structures moléculaires de la mifépristone (A) et de la spironolactone (B)

d. Diazépam

Le diazépam est une molécule de la famille des benzodiazépines, commercialisé en 1963, sous le nom de Valium®. Le diazépam est utilisé dans le traitement symptomatique des manifestations

anxieuses sévères. Il permet également de réduire les manifestations physiques et l'anxiété induites par le sevrage alcoolique ainsi que de prévenir et traiter le delirium tremens. La solution de diazépam est réalisée à partir de Valium® injectable (10mg/2ml, Roche) diluée une solution physiologique (NaCl 0,9%) à une concentration de 1mg/kg, 0.5mg/kg, 0.25mg/kg et 0.125mg/kg. Les solutions sont injectées par voie ip à un volume de 10ml/kg pendant 9 jours ; deux doses ont été testées (annexe 5): 1mg/kg et 0.5 mg/kg, avant d'être progressivement diminué pendant 3 jours consécutifs comme décrits sur la figure ci dessous.

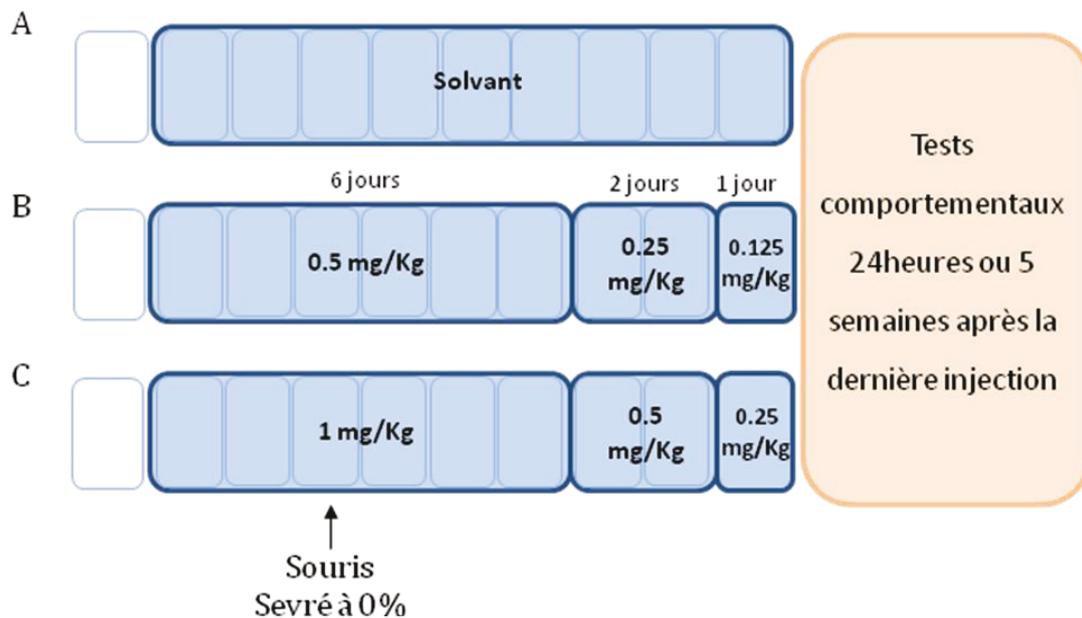


Figure 29 : schéma du traitement au diazépam sur 9 jours consécutifs.

(A) Les souris solvant reçoivent comme unique traitement une injection de NaCl (0.9%). Les groupes *Contrôle* ou *Sevré* traités au diazépam reçoivent pendant 6 jours soit des injections à 0.5mg/kg (B), soit à 1mg/kg (C). Les doses sont ensuite progressivement diminuées sur 3 jours. Les souris *Contrôle* ou *Sevré* réalisent ensuite les tests comportementaux soit 24 heures après la dernière injection (correspondant à une semaine de sevrage, *Sevré 1S*) soit 5 semaines après la dernière injection (correspondant à 6 semaines de sevrage, *Sevré 6S*).

D. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel statistique Statview[®]. Les comparaisons entre les groupes sont effectuées par une analyse de variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs, avec des mesures répétées ou non selon le cas. Cette analyse est suivie d'un test statistique post-hoc, le test Bonferroni, permettant la comparaison deux à deux des données de tous les groupes expérimentaux. Pour l'analyse comportementale, nous avons également réalisé un test t de Student pour comparer les performances moyennes par rapport au niveau du hasard fixé à 50% dans le test d'AS.

Enfin, pour les concentrations de corticostérone cérébrale, les mesures sont répétées pour chaque animal. Chaque résultat est exprimé en fonction du pourcentage par rapport aux valeurs basales moyennées sur l'heure précédant le test. Les effets de l'alcoolisation, du sevrage, du stress chronique et des injections (solvant versus traitement) sont comparés par une analyse de variance à deux ou trois facteurs en mesures répétées, suivi par le test post-hoc de Bonferroni lorsque nécessaire. La significativité statistique est établie à $p \leq 0.05$, avec pour représentation graphique * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Partie Expérimentale

Chapitre I :

L'amélioration de l'activité pCREB dans le cortex préfrontal restaure la mémoire de travail altérée par un sevrage à l'alcool

A. Introduction

Des études cliniques montrent que les faibles performances des patients alcooliques sevrés corrélaient avec le nombre d'épisode de sevrage et les quantités d'alcool consommés (Errico et al., 2002). En effet, le sevrage à l'alcool après une CCA altère la plupart des fonctions cognitives qui reposent sur le CPF (Moselhy et al., 2001, Pfefferbaum et al., 2001, Chanraud et al., 2010) induisant des troubles cognitifs et notamment une altération de la MDT, dépendante de l'intégrité fonctionnelle du CPF et de son interaction avec l'HPC (Beracochea et al., 1987a, George et al., 2012).

Cependant, malgré les observations révélant le rôle critique de la phosphorylation de CREB et de l'acétylation des histones dans l'émergence des déficits de mémoire induit par le sevrage, il n'a jamais été testé si ces déficits sont potentiellement réversibles par des traitements qui activent la cascade AMPc/PKA/CREB dans le CPF et/ou l'HPC. En outre, la grande majorité de ces études a porté sur l'élucidation des changements comportementaux et moléculaires associés aux périodes de sevrage aigu, alors que les troubles cognitifs sont observés de façon durable chez l'homme. Pour répondre à ces questions, nous avons alcoolisé des souris pendant 6 mois puis nous avons évalué l'effet de l'alcoolisation ou d'un sevrage court (une semaine, 1S) ou long (6 semaines, 6S) sur la MDT, les niveaux de pCREB et l'acétylation des histones (H3 et H4) dans le CPF et l'HPC. Nous avons également comparé les deux groupes *Sevré* à un modèle de référence de la dépression, le SCLI connu pour induire des troubles de la voie de signalisation AMPc/PKA/CREB (Xu et al., 2006, Liu et al., 2014). Cette comparaison a été réalisée afin de déterminer les modifications moléculaires et comportementales spécifiquement provoquées par le sevrage et non par le stress chronique. Dans un deuxième temps, les conséquences comportementales et moléculaires de l'activation de la PKA via l'inhibition de la PDE-IV, ont été examinées chez les groupes *Contrôle*, *Sevré* et *SCLI*. Enfin, afin d'identifier la contribution spécifique des fonctions du CPF et de l'HPC, nous avons étudié si une perfusion directe d'un activateur de la PKA, le Sp-cAMPS dans le CPF ou l'HPC dorsal influence, de façon différentielle les performances de MDT chez les souris *Sevré*.

B. Méthodologie

Ce chapitre est composé de 3 expériences sur trois cohortes de souris indépendantes, ayant pour but de mettre en évidence les perturbations moléculaires associées aux troubles de la MDT induit spécifiquement par le sevrage et non par l'alcoolisation ou le protocole de SCLI.

Expérience 1. Effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI, sur la MDT, la phosphorylation de CREB et l'acétylation des histones dans le CPF et l'HPC.

Trente minutes après le début du test d'AS, les souris (*Contrôle* n=11, *Alcool* n=10, *Sevré 1S* n=9, *Sevré 6S* n=1, *SCLI* n=10) sont sacrifiées pour l'immunohistochimie de CREB phosphorylé (pCREB) ainsi que de H3 et H4 acétylées (Ac-H3 et Ac-H4). Des souris naïves sont également sacrifiées directement à partir de leur cage d'origine afin de mesurer les variations de pCREB, de Ac-H3 et Ac-H4 induites par le test de MDT (*Contrôle* n=10, *Alcool* n=6, *Sevré 1S* n=8, *Sevré 6S* n=7, *SCLI* n=6).

Expérience 2. Effets de l'inactivation systémique de la PDE-IV sur les performances de MDT et les niveaux de pCREB, Ac-H3 et Ac-H4.

Le rolipram (0.1 mg/kg), un inhibiteur de la PDE-IV, a été dissous dans 1% de DMSO (Reneerkens et al., 2009, Zhang et al., 2010), avant d'être injecté trente minutes avant le début du test de MDT par voie ip. Les souris ont reçu soit une injection de rolipram (*Contrôle* n=10, *Sevré 1S* n=9, *Sevré 6S* n=9 et *SCLI* n=7) soit de solvant (*Contrôle* n=9, *Sevré 1S* n=9, *Sevré 6S* n=8 et *SCLI* n=8) avant d'être sacrifiées 30 minutes après le début du test de MDT pour l'immunohistochimie de pCREB. Des souris naïves demeurant dans leur cage ont également été traitées de façon identique avec le rolipram (*Contrôle* n=6, *Sevré 1S* n=4, *Sevré 6S* n=5 et *SCLI* n=4) ou avec le solvant (*Contrôle* n=6, *Sevré 1S* n=4, *Sevré 6S* n=4 et *SCLI* n=5) une heure avant leur sacrifice.

Expérience 3. Effets de l'injection bilatérale de Sp-cAMPS en intra-CPF ou intra-CA1 dorsal sur la MDT chez les souris sevrées.

Des souris *Contrôle* et *Sevré* ont été anesthésiées puis implantées bilatéralement avec des guides-canules au-dessus du CPF et du CA1 dorsal. Après 15 jours de récupération, les souris (*Contrôle* n=10, *Sevré 1S* et *6S* n=9 par groupe) ont reçu 15 minutes avant le début du test de MDT une injection in situ d'un activateur de la PKA, le Sp-cAMPS (Sp-diastéréoisomère de l'AMPc; Tocris Bioscience) (Punch et al., 1997) dans le CPF (0.1µl/minute pendant 2,5 minutes) ou le CA1 dorsal

(0.1µl/minute pendant 5 min). Des groupes de souris indépendants ont reçu du LCRA (*Contrôle* n=9, *Sevré 1S* et *6S* n=8 par groupe). Pour chaque souris, la même procédure d'injection a été répétée 72 heures plus tard, mais le lieu de l'injection a été alterné ; les souris infusées dans le CPF ont été injectées dans le CA1 dorsal au deuxième passage et vice versa. Après le test de MDT, les animaux ont été sacrifiés afin de vérifier l'emplacement de canules.

C. Résultats

Expérience 1. Le sevrage et le SCLI induisent une altération de la MDT associée à une réduction de pCREB et d'Ac-H4 dans le CPF.

Test de d'alternance spontanée

Les groupes *Contrôle* et *Alcool* alternent significativement au dessus du hasard fixé à 50% (*Contrôle* : 75.76 ± 4.12 %; $t(10) = 6.25$, $p < 0.001$; *Alcool* : 80.0 ± 6.48 %; $t(9) = 4.63$, $p < 0.001$) alors que les groupes *Sevré 1S/6S* et *SCLI* répondent au hasard (*1S*: 50.0 ± 3.92 %, $p = \text{NS}$; *6S*: 53.33 ± 4.84 %, $p = \text{NS}$; *SCLI*: 53.33 ± 5.44 %, $p = \text{NS}$). L'ANOVA réalisée sur les taux d'alternance fait apparaître une différence significative entre les groupes ($F_{(4,45)} = 7.87$; $p < 0.001$) et l'analyse post-hoc confirme l'altération de l'alternance au sein des groupes *Sevré 1S/6S* et *SCLI* par rapport aux groupes *Contrôle* et *Alcool* ($p < 0.002$ pour toutes les comparaisons).

La **figure 30B** représente le pourcentage d'alternance réalisée lors des 3 premiers essais (Bloc A : essais 2, 3 et 4) et des 3 derniers essais (Bloc B : essais 5, 6 et 7). L'analyse ANOVA révèle un effet significatif du facteur *Bloc* ($F_{(1,45)} = 8.67$; $p = 0.005$) ainsi qu'une interaction *groupe X bloc* ($F_{(4,45)} = 2.34$; $p = 0.05$), indiquant que l'évolution des performances du bloc A au bloc B est différente entre les groupes. En effet, au bloc B, les résultats témoignent d'une différence significative entre les groupes ($F_{(4,45)} = 8.86$; $p < 0.001$) ce qui n'est pas le cas au bloc A ($F_{(4,45)} = 1.05$; NS).

De plus, la latence de choix sur les 7 essais n'est pas significativement différente entre les groupes quel que soit le facteur considéré (**Fig. 30C**, $p > 0.05$ pour toutes les comparaisons). Les taux d'alternance au dernier essai (8^{ème} essai évalué avec un IEE de 5 secondes après la fin de la série de 7 essais) sont semblables et élevés (plus de 70%) pour tous les groupes ($F_{(4,45)} = 0.9$; NS) démontrant que la motivation à alterner n'est pas altérée par le nombre d'essais successifs (**Fig. 30D**).

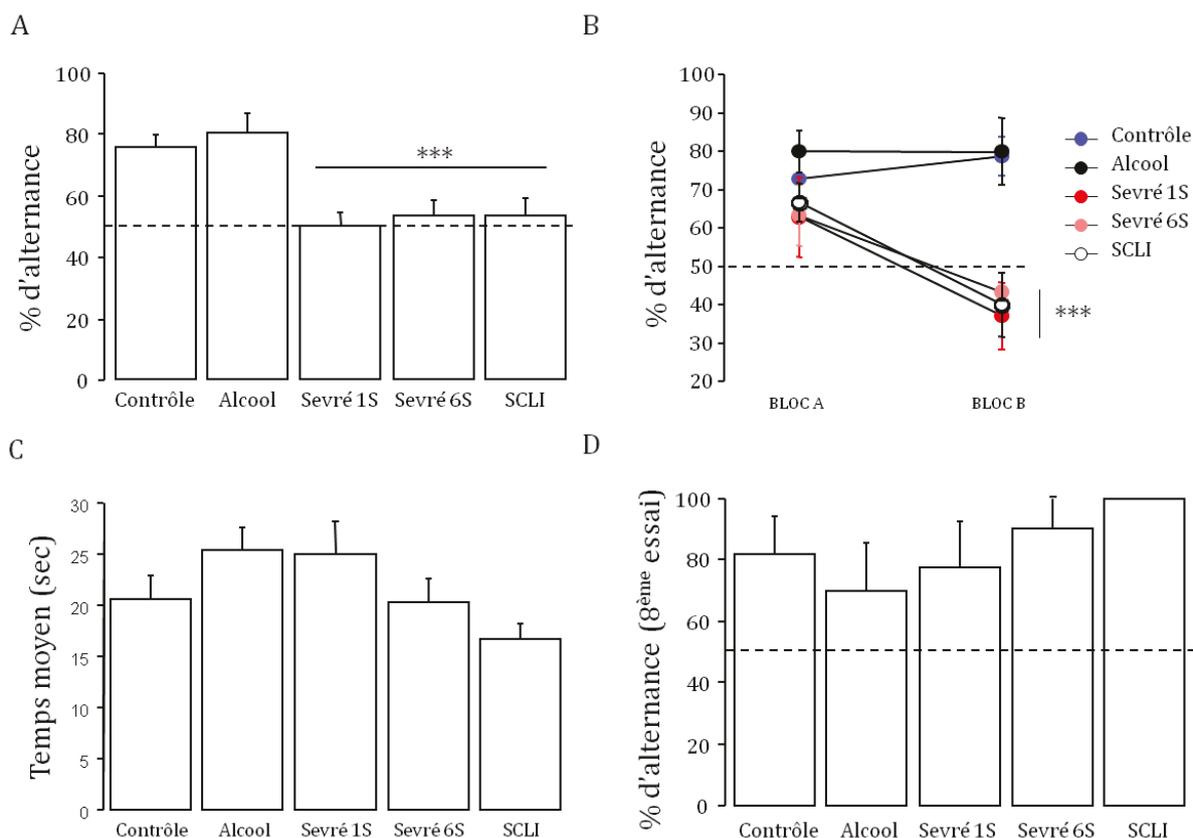


Figure 30 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur les performances d'AS.

(A) Les groupes *Sevré 1S*, *6S* et *SCLI* présentent un déficit de MDT par rapport aux groupes *Contrôle* et *Alcool* *** $p < 0.001$. (B) Les souris *Sevré 1S/6S* et *SCLI* ont un niveau d'alternance différent au second bloc d'essai (essais 5, 6 et 7) mais pas au premier bloc (essais 2,3 et 4). *** $p < 0.001$ vs *Contrôle* et *Alcool*. (C) Le temps moyen de latence de choix n'est pas significativement différent entre les groupes. (D) Les groupes ont un niveau d'alternance semblable au 8^{ème} essai avec un IEE à 5sec.

Phosphorylation de CREB.

Nous avons ensuite déterminé les niveaux de pCREB dans le CPF et l'HPC (régions CA1 dorsal et ventral) au sein des cinq groupes expérimentaux.

Condition naïve : les résultats obtenus en condition naïve sont présentés en nombre de noyau marqué par mm² (**Fig. 31A**). L'alcoolisation, le sevrage et la procédure de SCLI induisent des effets différents et région spécifique sur le niveau basal de pCREB. En effet, l'analyse ANOVA montre un effet *groupe* seulement dans la région dorsale du CA1 ($F_{(4,32)}=2.74$; $p < 0.04$) mais non dans le CPF ($F_{(4,32)}=1.26$; NS) ni le CA1 ventral ($F_{(4,32)}=0.7$; NS). L'analyse post-hoc confirme que le sevrage induit une augmentation transitoire du niveau basal de pCREB ($p=0.003$ *Sevré 1S* vs *Contrôle*).

Condition test : les variations de pCREB induites par le test de MDT sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux naïves (**Fig. 31B**). L'analyse de la variance révèle des différences significatives dans le CPF ($F_{(4,45)}=8.43$; $p < 0.001$) et le CA1 dorsal ($F_{(4,45)}=8.44$; $p < 0.001$) mais non dans le CA1 ventral ($F_{(4,45)}=0.9$; NS).

L'analyse restreinte au **CPF** montre que les niveaux pCREB sont augmentés considérablement après le test de MDT dans les groupes *Contrôle* ($p=0.002$) et *Alcool* ($p=0.03$), mais pas au sein des deux groupes *Sevré* et du groupe *SCLI* ($p=NS$), par rapport à leurs groupes naïfs respectifs. Cette observation est confirmée par l'analyse post-hoc qui atteste d'une augmentation de pCREB significativement plus élevée chez les groupes *Contrôle* et *Alcool* (*Sevré 1S*: $p < 0,01$ vs *Contrôle*; *Sevré 6S* et *SCLI*: $p < 0,001$ vs *Contrôle* et *Alcool*).

Dans le **CA1 dorsal**, une activation différentielle de CREB a également été observée après le test de MDT en fonction du groupe étudié. Plus précisément, le groupe *Contrôle* affiche un taux de pCREB significativement plus élevé après le test de MDT que les souris *Contrôle* naïfs ($p < 0,001$), tandis qu'aucun effet du test n'a été observé dans les autres groupes ($p > 0,1$). Les comparaisons post-hoc confirment des différences significatives entre le groupe *Contrôle* et les autres groupes (*Alcool*: $p=0,01$; *Sevré 1S/6S* et *SCLI* $p < 0,001$ vs *Contrôle*) qui ne diffèrent pas significativement les uns des autres. La **figure 31C** représente l'immunoréactivité de pCREB dans le CPF pour chacun des groupes expérimentaux en conditions naïve et test.

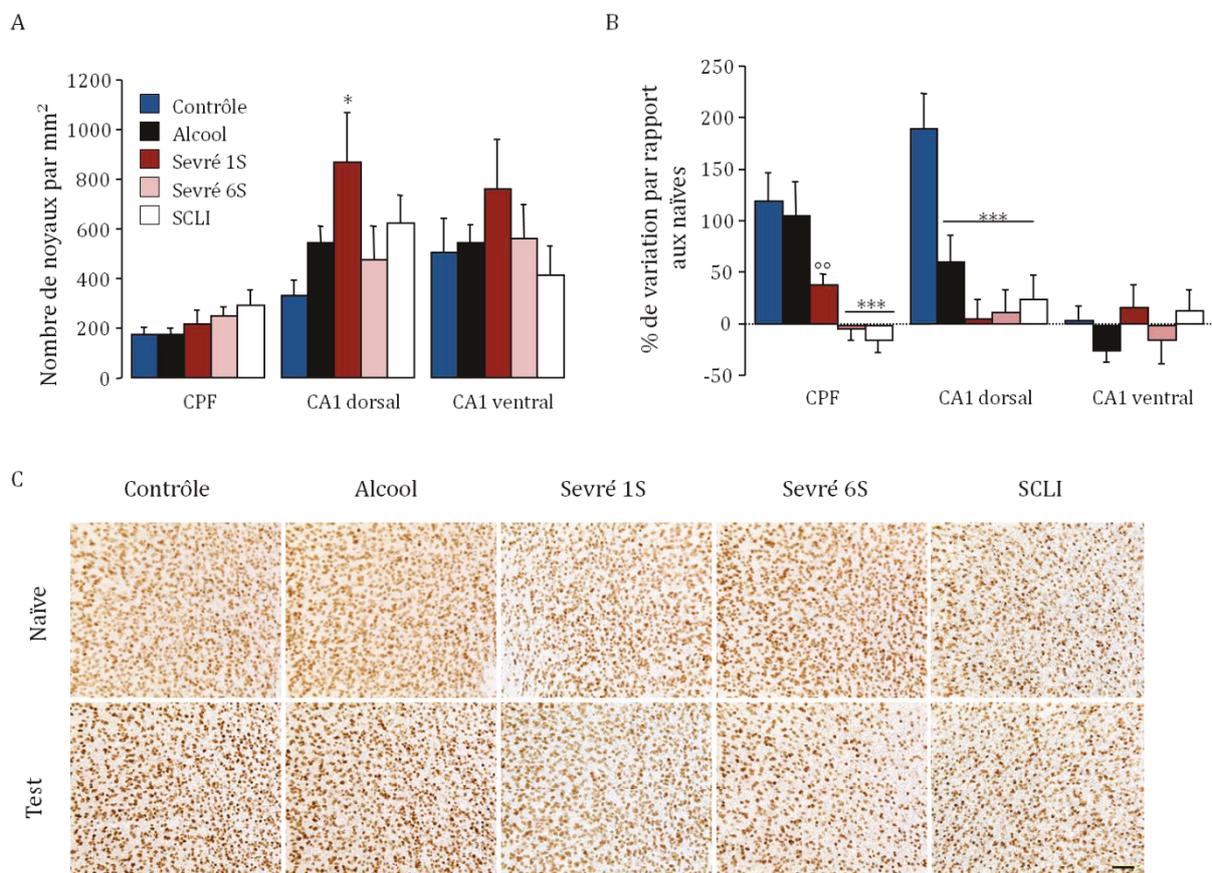


Figure 31 : étude de l'immunoréactivité pCREB en conditions naïve et test.

(A) En condition naïve, les résultats montrent que le sevrage induit une augmentation transitoire de niveau de pCREB dans le CA1 dorsal. $*p=0.003$ Sevré 1S vs *Contrôle*. (B) En condition test, les résultats montrent que le CPF et le CA1 dorsal (mais pas la région ventrale) sont recrutés lors de l'épreuve d'AS et que les groupes *Sevré* et *SCLI* présentent un déficit d'activation de pCREB dans le CPF et le CA1 dorsal. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. (C) Illustrations de l'immunoréactivité de pCREB dans le CPF. Barre d'échelle 50 μ m et grossissement X20.

Effets du sevrage et du SCLI sur l'acétylation des histones.

Sur les mêmes animaux, nous avons ensuite déterminé si le sevrage et le SCLI induisent également des modifications de l'état d'acétylation des histones H3 et H4 dans le CPF et le CA1 (dorsal et ventral).

Condition naïve : dans le CPF (**Fig. 32A**), les analyses ANOVA indiquent un effet *groupe* sur le niveau basal de Ac-H3 ($F_{(4,32)}=4.97$; $p<0.003$) et de Ac-H4 ($F_{(4,32)}=2.77$; $p=0.044$). L'analyse post hoc confirme l'hyper-acétylation de H3 chez les *Sevré 1S* par rapport aux groupes *Contrôle*, *Alcool* et *SCLI* ($p<0.002$). De la même façon, des différences significatives sont observées entre les groupes dans le CA1 dorsal (**Fig. 32B**) pour Ac-H3 ($F_{(4,32)}=2.86$; $p=0.039$) et Ac-H4 ($F_{(4,32)}=3.56$; $p<0.016$) et sont confirmées pour Ac-H4 entre le groupe *Contrôle* et *Sevré 1S* ($p=0.002$) par l'analyse post-hoc.

Dans le CA1 ventral (**Fig. 32C**), l'analyse montre un effet groupe seulement pour Ac-H3 ($F_{(4,32)}=3.42$; $p=0.019$) mais pas pour Ac-H4 ($F_{(4,32)}=1.20$; NS).

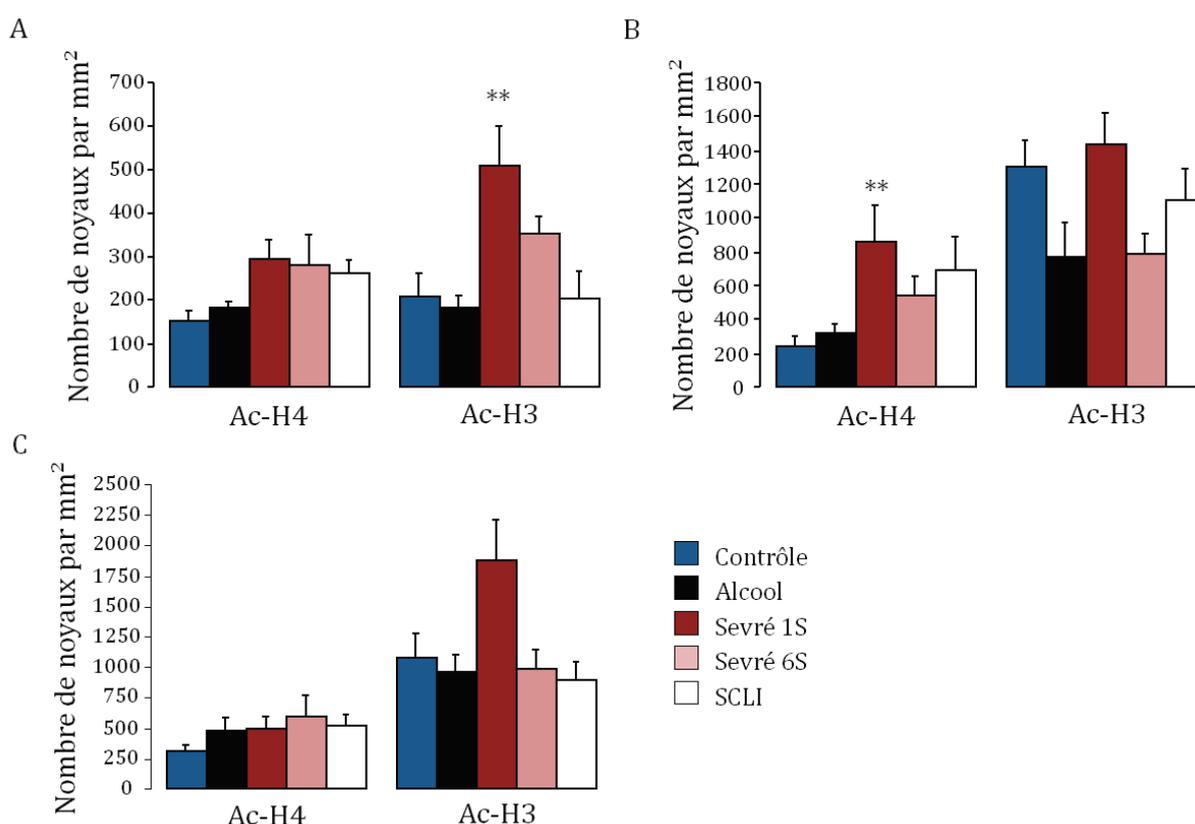


Figure 32 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'acétylation de H3 et H4 en condition naïve. **(A)** Dans le CPF, le sevrage induit l'augmentation transitoire d'Ac-H3. $***p<0.01$ vs *Contrôle*, *Alcool* et *SCLI*. **(B)** Dans le CA1 dorsal, le sevrage (*1S*) induit une augmentation transitoire d'Ac-H4. $***p<0.01$ vs *Contrôle*. **(C)** L'analyse post-hoc ne révèle aucune différence significative entre les groupes dans le CA1 ventral. Les résultats sont présentés en nombre de noyaux marqués par mm^2 .

Condition test : des différences d'acétylation sont mises en évidence entre les groupes par l'analyse ANOVA seulement pour Ac-H4 dans le CPF (**Fig. 33A**) ($F_{(4,45)}=7.95$; $p<0.001$) et le CA1 dorsal (**Fig. 33B**) ($F_{(4,45)}=7.51$; $p<0.001$) mais pas dans le CA1 ventral (**Fig. 33C**) ($F_{(4,45)}=1.08$; NS).

Les analyses post-hoc confirment des niveaux significativement plus élevés de Ac-H4 au sein du groupe *Contrôle* par rapport aux autres groupes dans le CPF ($p \leq 0,004$ *Alcool*, *Sevré 1S/6S* et *SCLI vs Contrôle*) et le CA1 dorsal ($p \leq 0,002$ *Sevré 1S* et *6S* et *SCLI vs Contrôle*). En outre, aucun changement lié au test de MDT n'est détecté pour Ac-H3, indépendamment de la région analysée (CPF : ($F_{(4,45)}=1.71$; NS ; CA1 dorsal ($F_{(4,45)}=1.98$; NS ; CA1 ventral ($F_{(4,45)}=0.35$; NS).

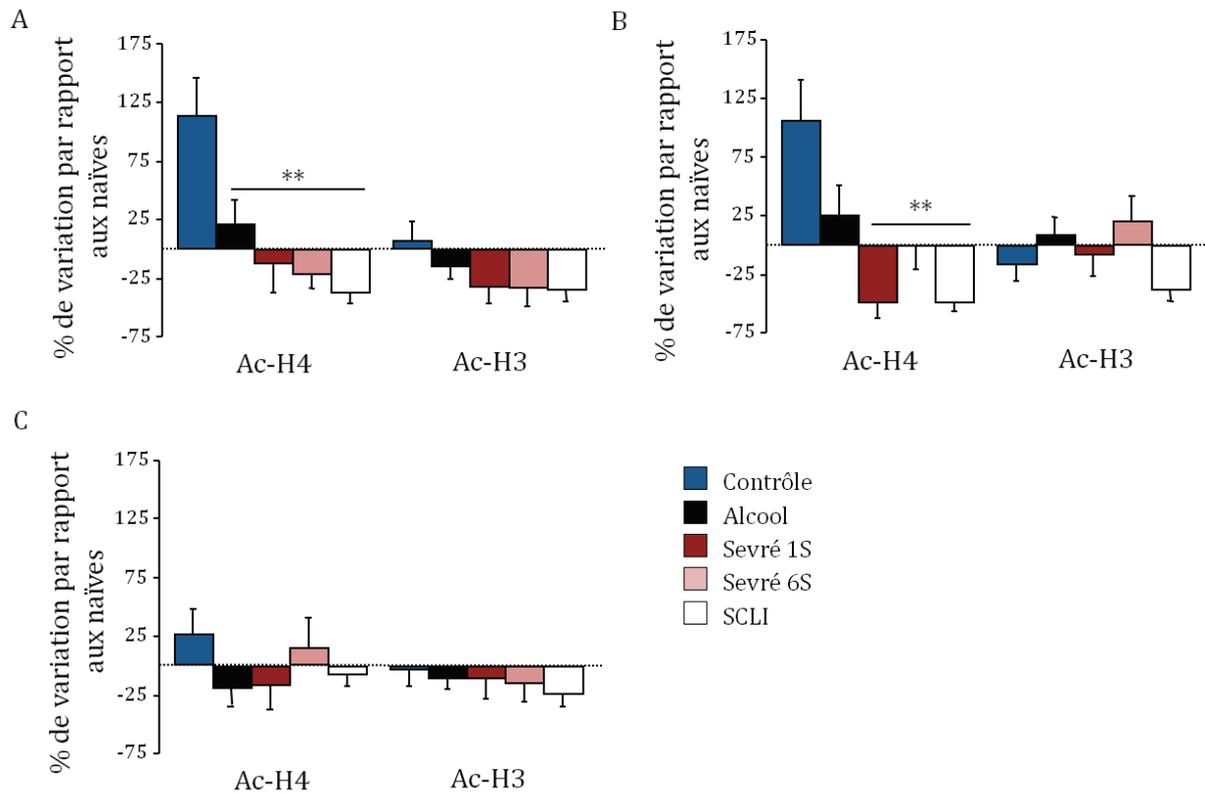


Figure 33 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'acétylation de H3 et H4 en condition test. **(A)** Dans le CPF, le test induit l'augmentation d'Ac-H4 seulement chez les *Contrôle*. ** $p < 0.01$ vs *Contrôle*. **(B)** Dans le CA1 dorsal, l'augmentation d'Ac-H4 induite par le test est plus élevée chez le groupe *Contrôle*. ** $p < 0.01$ vs *Contrôle* **(C)** En revanche, dans le CA1 ventral, le test ne modifie pas les niveaux d'acétylation de H4 et H3. Les résultats sont présentés en % de variations par rapport aux animaux naïfs respectifs.

Conclusion : Le sevrage mais non l'alcoolisation chronique induit des déficits de MDT associés à une réduction de pCREB et d'Ac-H4 dans le CPF et le CA1 dorsal. En revanche, le CA1 ventral et l'Ac-H3 ne semblent pas impliqués dans le test de MDT. De plus, les analyses ne témoignent pas de l'implication fonctionnelle du déficit d'Ac-H4 dans la MDT puisque les souris alcoolisées présentent également un déficit d'Ac-H4 sans pour autant avoir de trouble de la MDT. De plus, nos données montrent que le SCLI induit des perturbations de la MDT et de pCREB, dans le CPF et le CA1 dorsal, comparables aux souris sevrées.

Expérience 2. Le rolipram atténue les déficits de MDT et rétablit les niveaux de pCREB des souris *Sevré* et *SCLI*.

Les effets de l'augmentation de la phosphorylation de CREB sur les performances de MDT ont été analysés en comparant les animaux ayant reçu le solvant à des animaux traités avec le rolipram. Au vu des résultats de l'Expérience 1, l'analyse de l'effet du rolipram portera uniquement sur les niveaux de pCREB dans le CPF et le CA1 dorsal, car ces deux structures cérébrales semblent plus spécifiquement impliquées dans le test de MDT. De plus, cette expérience n'est pas réalisée sur les animaux toujours alcoolisés qui ne présentent pas de troubles de la MDT.

Test d'alternance spontanée

Au sein des groupes recevant la solution solvant (**Fig. 34A**), les performances des souris *Contrôle* sont supérieures au hasard (50%) ($74.07 \pm 4.04\%$; $t(8)=5.96$, $p<0.001$), ce qui n'est pas le cas des groupes *Sevré* et *SCLI* qui répondent au hasard (*IS*: $58.33 \pm 5.45\%$; $t(7)=1.53$, NS; *6S*: $54.17 \pm 2.73\%$; $t(7)=1.53$, NS; *SCLI*: $52.08 \pm 4.9\%$; $t(7)=0.42$, NS). L'analyse de la variance confirme une différence significative entre les groupes ($F_{(3,29)}=5.04$; $p=0.004$), les taux d'alternance étant significativement plus élevés chez les souris *Contrôle* que dans les autres groupes ($p \leq 0,015$ pour toutes les comparaisons). L'administration systémique de rolipram améliore les performances des deux groupes *Sevré* (*IS*: $75.0 \pm 5.45\%$; $t(7)=4.58$, $p=0.002$; *6S*: $79.63 \pm 3.70\%$; $t(8)=8.0$, $p<0.001$) et des souris *SCLI* ($73.81 \pm 4.95\%$; $t(6)=4.8$, $p<0.003$). En revanche, les souris *Contrôle* traitées avec le rolipram répondent au hasard ($48.33 \pm 3.89\%$; $t(9)=-0.43$; NS) et ont des performances significativement plus faibles que les *Contrôle*/solvant ($p<0.001$) ou que les souris *Sevré IS/6S* et *SCLI* traitées avec le rolipram ($p<0.001$ pour les trois comparaisons).

Aucun effet n'est observé sur la latence de choix, quel que soit le groupe ou le traitement considéré (**Fig. 34B**, $p>0.05$ pour toutes les comparaisons). De plus, le sevrage et le SCLI n'affectent pas le taux d'alternance du 8^{ème} essai (réalisé avec un IEE de 5 secondes, **Fig. 34C**), indiquant que la motivation à alterner au cours du test n'est pas altérée.

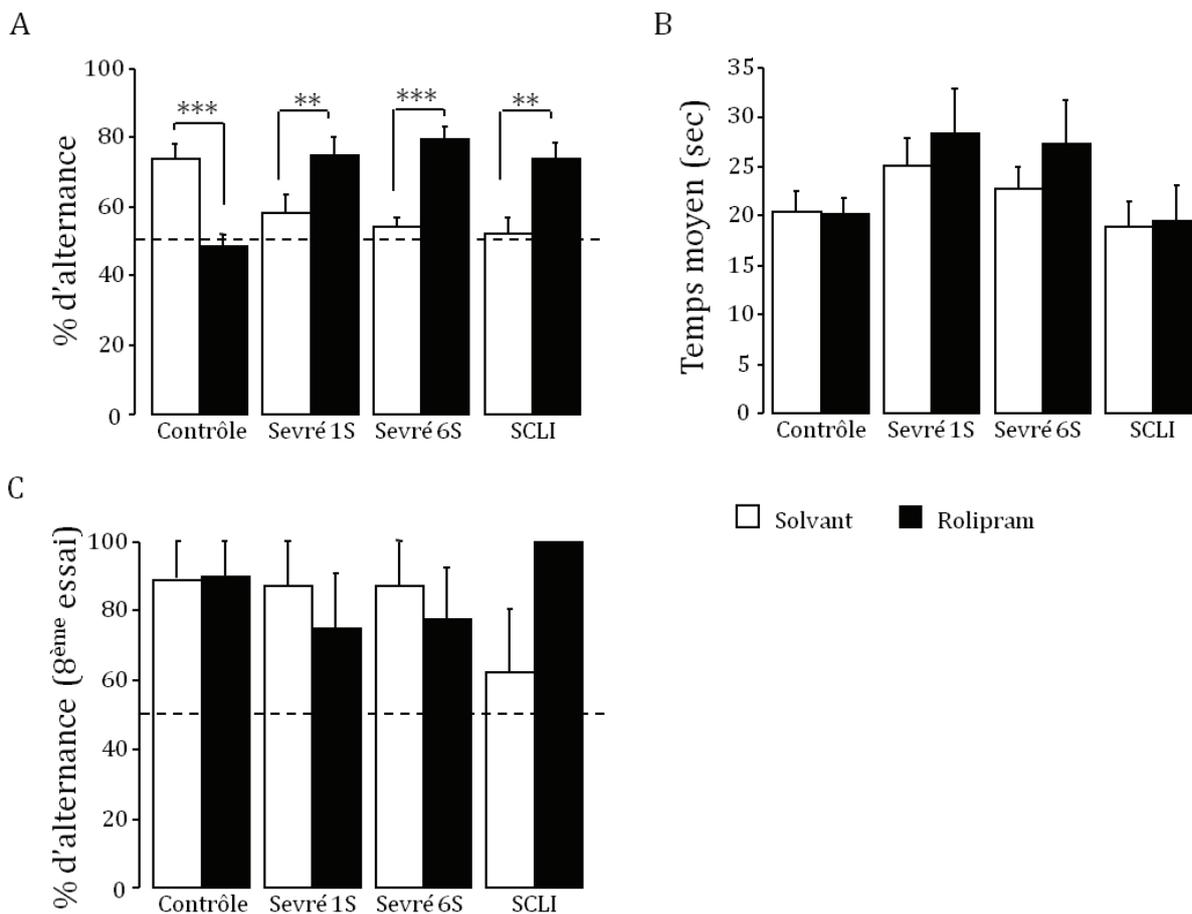


Figure 34: effets du rolipram sur les performances d'AS.

(A) Le rolipram améliore les performances des groupes *Sevré 1S/6S* et *SCLI* mais perturbe le groupe *Contrôle*. ** $p < 0.01$ vs solvant, *** $p < 0.001$ vs solvant. **(B)** Le temps moyen de latence de choix de diffère pas entre les groupes **(C)** Les groupes ont un niveau d'alternance semblable au 8^{ème} essai avec un IEE de 5sec.

Phosphorylation de CREB

L'effet du rolipram sur la phosphorylation de CREB a été étudié en conditions naïve et test au sein des différents groupes expérimentaux.

Condition naïve : les effets *groupe* et *traitement* ont été analysés dans les deux structures d'intérêt. Les résultats n'indiquent pas de différences significatives quel que soit le facteur considéré (*traitement* et *groupe* ; NS dans toutes les comparaisons, données non représentées).

Condition test : pour tester les effets spécifiques du rolipram, les niveaux de pCREB ont été mesurés dans le CPF et le CA1 dorsal chez des souris solvant ou rolipram. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport aux souris naïves respectives.

Les analyses de variance de pCREB dans le CPF (**Fig. 35A**) ($F_{(3,61)}=11.68$, $p < 0.001$) et dans le CA1 dorsal ($F_{(3,61)}=11.53$, $p < 0.001$) révèlent d'importantes différences inter-groupes ainsi qu'un effet significatif du *traitement* dans le CPF ($F_{(1,61)}=22.14$, $p < 0.001$), sans interaction notable entre les facteurs ($F_{(3,61)}=2.36$, NS). Plus précisément, les souris *Sevré* et *SCLI* présentent une réduction considérable des niveaux de pCREB par rapport à des souris *Contrôle*, indépendamment du fait

qu'elles ont été traitées avec le solvant (pour tout les groupes: $p < 0.002$) ou rolipram (*Sevré 1S* et *SCLI*: $p < 0.01$). Toutefois, au regard du facteur *traitement*, le niveau de pCREB est augmenté au sein des souris traitées avec le rolipram par rapport aux groupes solvant respectifs (*Contrôle*, *Sevré 1S* et *6S*: $p \leq 0.02$; *SCLI* $p = 0.06$).

Dans le **CA1 dorsal (Fig. 35B)**, malgré les différences inter-groupe, aucun effet *traitement* ($F_{(1,61)} = 2.16$, NS) ou d'interaction des facteurs n'est observé ($F_{(3,61)} = 0.55$, NS). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'amélioration ou l'altération de la MDT résulte des changements dans pCREB spécifiquement dans le CPF.

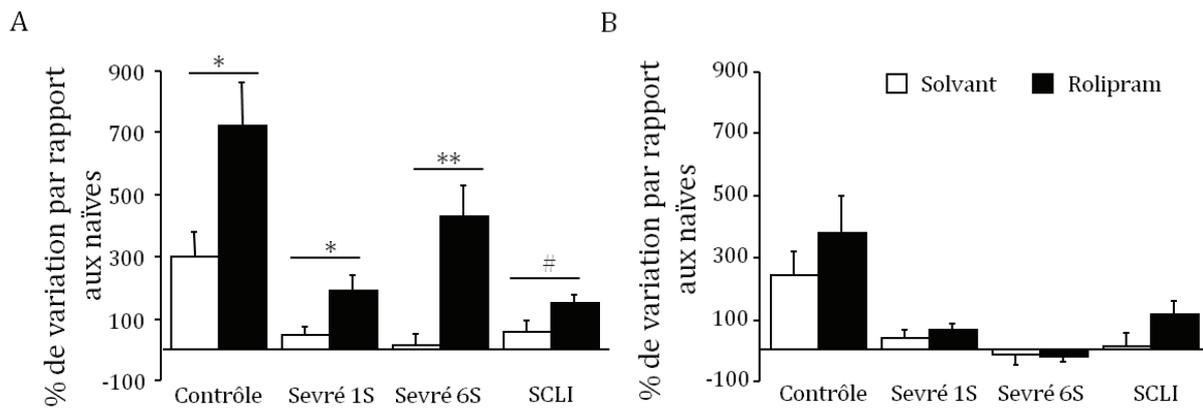


Figure 35: effets du rolipram sur la phosphorylation de CREB après un test de MDT.

(A) Le rolipram induit l'augmentation de la phosphorylation de CREB dans le CPF # $p = 0.06$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (B) mais pas dans le CA1 dorsal.

Conclusion: Le Rolipram induit un effet cognitif **bidirectionnel** chez les souris *Contrôle* (**perturbation**) et *Sevré (1S/6S)* ou *SCLI* (**facilitation**) sur la MDT en augmentant la fonction pCREB dans le CPF mais non dans le CA1 dorsal.

Expérience 3. L'injection in situ de Sp-cAMPS dans le CPF, mais non dans l'HPC dorsal, atténue les déficits de MDT induits par le sevrage.

Pour compléter l'étude de l'implication relative du rôle du CPF et de la région CA1 dorsale de l'HPC dans l'émergence des troubles de la MDT associés au sevrage, nous avons testé les effets de l'augmentation aiguë de la phosphorylation de CREB dans le CPF ou le CA1 dorsal sur les performances de MDT chez les souris *Contrôle*, *Sevré 1S* et *6S*.

Dans ce but, des infusions bilatérales de Sp-cAMPS ou du solvant ont été effectuées dans le CPF ou dans le CA1 dorsal 15 minutes avant le test de MDT (**Fig. 36A et C**). La **figure 36B** montre que, lorsque le solvant est injecté dans le CPF, les souris *Contrôle* présentent des taux d'alternance

significativement supérieurs au hasard ($74.07 \pm 4.90\%$; $t(8)=4.92$, $p=0.001$) mais pas les animaux *Sevré* (*1S*: $47.92 \pm 7.99\%$; $t(7)=-0.26$; NS ; *6S*: $50.0 \pm 5.45\%$; $t(7)=-0.001$; NS; *Contrôle vs Sevré 1S* et *6S* $p < 0.01$). En revanche, l'injection aigue intra-CPF de Sp-cAMPS améliore les performances des groupes *Sevré* (*1S*: $68.52 \pm 4.34\%$; $t(8)=4.26$, $p < 0.01$; *6S* : $72.22 \pm 3.93\%$; $t(8)=5.66$, $p < 0.001$), mais détériore les performances du groupe *Contrôle* ($51.66 \pm 2.99\%$; $t(9)= 0.55$; NS). Les deux groupes *Sevré* traités avec le Sp-cAMPS montrent une élévation du pourcentage d'alternance par rapport au groupe *Contrôle* traité avec le Sp-cAMPS ($p < 0.001$ vs *1S* et *6S*). L'analyse centrée sur l'effet *traitement* confirme des différences significatives au sein des groupes, les taux d'alternance sont significativement diminués chez le groupe *Contrôle* ($p < 0.001$ vs solvant respectif) et sont, à l'opposé, augmenté chez les groupes *Sevré* (*1S* : $p < 0.05$ et *6S* : $p < 0.01$ vs solvant respectif) après l'injection de Sp-cAMPS.

Les latences de choix et le pourcentage d'alternance au 8^{ème} essai (IEE de 5 sec) ne diffèrent pas significativement entre les groupes, quel que soit le facteur considéré ($p > 0.5$ dans toutes les comparaisons, données non présentées).

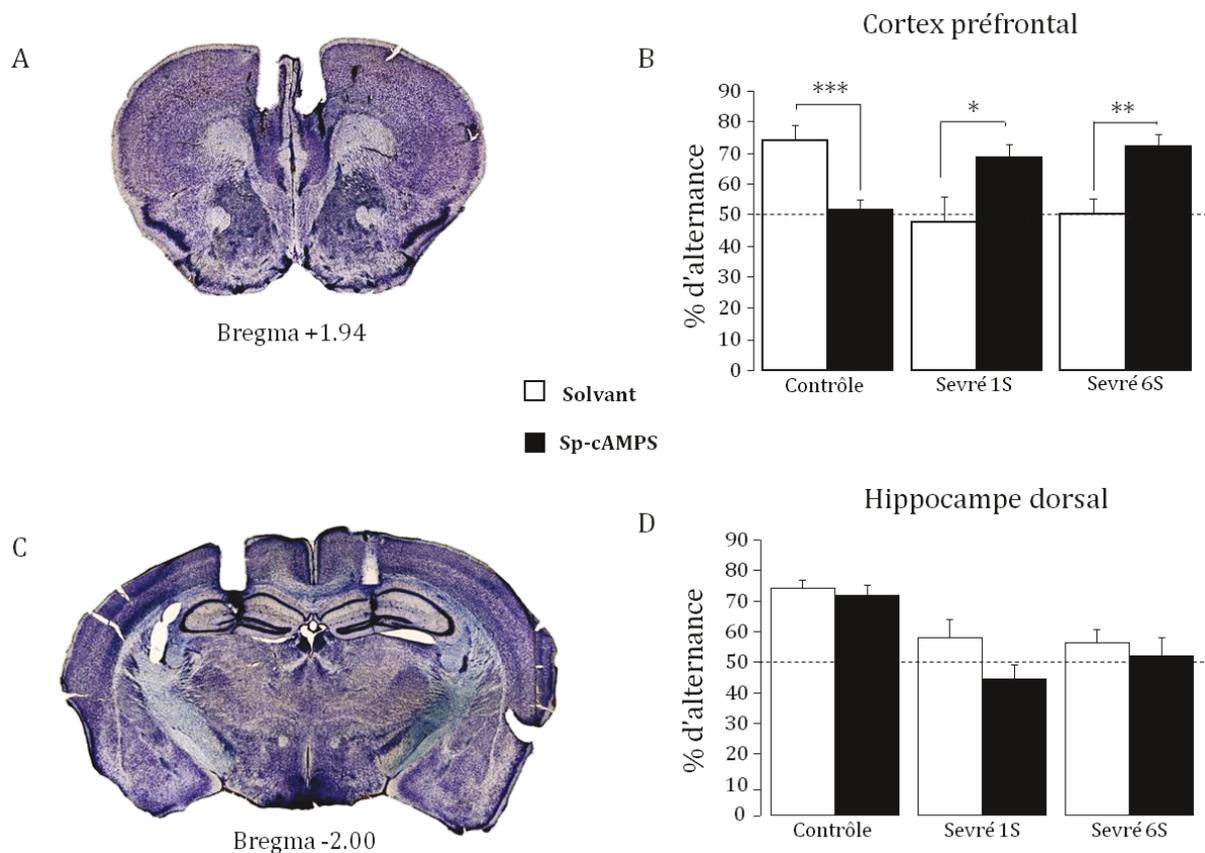


Figure 36 : effets de l'injection in situ de Sp-cAMPS dans le CPF ou l'HPC dorsal sur la MDT.

(A) Illustration du site d'injection dans le CPF. (B) Dans le CPF, le Sp-cAMPS induit un effet bidirectionnel, une détérioration de la MDT des souris *Contrôle* et à l'inverse une facilitation chez les souris *Sevré*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$. (C) Illustration du site d'injection dans l'HPC dorsal. (D) Le Sp-cAMPS ne modifie les performances de MDT des différents groupes expérimentaux quand il est injecté dans l'HPC dorsal.

L'injection intra-HPC de Sp-cAMPS n'a en revanche aucun effet sur les performances au sein des groupes *Contrôle* et *Sevré* (**Fig. 36D**). Les animaux *Contrôle* ont des taux d'alternance significativement supérieurs au hasard, indépendamment du fait qu'ils aient reçu le solvant ($74.07 \pm 2.93\%$; $t(8)=8.22$, $p<0.001$) ou le Sp-cAMPS ($71.67 \pm 3.56\%$; $t(9)=6.09$, $p<0.001$) alors que les groupes *Sevré* répondent au hasard (solvant-1S: $58.33 \pm 5.45\%$; $t(7)=1.53$; NS; solvant-6S: $56.25 \pm 4.38\%$; $t(7)=1.43$, NS ; Sp-cAMPS-1S : $44.44 \pm 4.81\%$; $t(8)=-1.15$, NS; Sp-cAMPS-6S: $51.85 \pm 6.48\%$; $t(8)=0.29$, NS). Quel que soit le traitement, les performances sont plus élevées chez les groupes *Contrôle* que chez les groupes *Sevré* ($p<0.05$).

Conclusion : Les résultats indiquent que l'augmentation de l'activité PKA/CREB dans le CPF mais pas dans l'HPC dorsal restaure la MDT chez les souris sevrées et détériore les performances des souris *Contrôle*.

D. Discussion

Cette première étude a permis de montrer l'existence d'importants déficits de MDT au sein des groupes *Sevré IS/6S* et *SCLI*. Plus précisément, le sevrage à l'alcool altère considérablement les performances de MDT dans une tâche d'AS dans un labyrinthe en T, que le sevrage soit court (une semaine) ou prolongé (6 semaines). En revanche, les souris toujours alcoolisées ne présentent pas de déficits de MDT dans ce test. Ces données confirment les résultats obtenus précédemment chez des souris Balb/c indiquant que les déficits de MDT n'apparaissent qu'après une durée d'alcoolisation de 12 mois (Beracochea et al., 1987a). De plus, les résultats montrent que le protocole de *SCLI* provoque également une altération de la MDT dans un test d'AS. Les faibles taux d'alternance observés chez les souris *Sevré* et *SCLI* ne sont pas provoqués par une diminution de la motivation ou de la capacité à alterner au cours d'une série d'essais puisque les performances au 8^{ème} essai avec un IEE de 5 secondes sont significativement au dessus du hasard. Ainsi, les déficits de MDT induits par le sevrage et le *SCLI* seraient provoqués par une augmentation de la vulnérabilité aux interférences proactives au cours d'une série d'essais. Ceci est démontré par la diminution des performances uniquement sur le deuxième bloc d'essais chez les souris *Sevré* et *SCLI*. Ainsi, nos résultats montrent que le sevrage et le *SCLI* altèrent la capacité des animaux à sélectionner l'information appropriée pour l'essai en cours, et de ce fait à supprimer les informations interférentes non pertinentes, ce qui constitue la fonction majeure de la MDT.

Les déficiences de MDT sont associées à une diminution de la phosphorylation de CREB dans le CPF et le CA1 dorsal spécifiquement mais pas dans le CA1 ventral. Les déficits comportementaux et moléculaires semblent être liés de manière sélective au sevrage à l'alcool ou au *SCLI* car le déficit de phosphorylation de CREB dans le CPF n'est pas observé chez les souris toujours alcoolisées. En effet, chez les animaux *Sevré* et *SCLI*, les perturbations de la MDT sont associées à une réduction de la phosphorylation de CREB dans le CPF et le CA1 dorsal alors que les souris *Alcool* montrent une diminution de niveaux de pCREB dans le CA1 dorsal seulement. Ainsi, ces résultats suggèrent que seul le déficit de phosphorylation de CREB dans le CPF est spécifiquement impliqué dans les déficits de MDT. La diminution de la phosphorylation de CREB et une réduction de l'expression des gènes cibles de CREB ont également été observées dans les structures corticales de rats sevrés à l'alcool (Pandey et al., 1999a, Pandey et al., 2001). Les groupes *Alcool* et *Sevré IS* affichent une réduction de la phosphorylation de CREB dans le CA1 dorsal par rapport au groupe *Contrôle*, ce qui suggère que les modifications de CREB dans l'HPC peuvent contribuer aux déficits comportementaux fréquemment observés lors de l'exposition à l'alcool et durant la phase aiguë du sevrage. Les changements anatomiques et neurochimiques qui se produisent dans l'HPC lors de l'exposition à

l'alcool sont considérés comme l'un des principaux mécanismes qui sous-tendent les altérations des fonctions dépendantes de l'HPC tels que la perte de la mémoire spatiale/contextuelle (pour revue, (Matthews and Morrow, 2000).

Nos résultats indiquent également que le sevrage à l'alcool et le SCLI affectent spécifiquement pCREB dans le CPF et le CA1 dorsal alors qu'aucune modification n'a été trouvée dans la région ventrale du CA1. Ces résultats corroborent les données actuelles attribuant un rôle «cognitif» à la région dorsale et une implication plus importante de la région ventrale dans les comportements émotionnels (Fanselow and Dong, 2010, Segal et al., 2010).

La diminution de l'acétylation des histones pourrait résulter d'une diminution de l'activité de CBP et de l'augmentation de l'activité des histones désacétylases (HDAC), au cours du sevrage après une exposition chronique à l'alcool (Pandey et al., 2008, Sakharkar et al., 2012). La diminution de l'activité de CBP est induite par la diminution de la phosphorylation de CREB provoquée par le sevrage ou le SCLI. La fonction HAT de la CPB permet l'acétylation des lysines présentes aux extrémités N-terminales des quatre histones du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4) rendant l'ADN plus accessible et donc transcriptionnellement actif. Une diminution de l'acétylation des histones est associée à une expression anormale de la plasticité des gènes liés à la mémoire (Pandey et al., 2008, Qiang et al., 2011, Pascual et al., 2012). Ici, nous avons constaté que le sevrage et le stress induisent une baisse concomitante de pCREB et d'Ac-H4, mais pas d'Ac-H3, dans le CPF et le CA1 dorsal, supportant un rôle fonctionnel de l'altération de l'acétylation de H4 dans la médiation des déficits de mémoire liés au sevrage ou au stress chronique. Des altérations de l'acétylation de l'histone H4 dans l'HPC dorsal ont déjà été impliquées dans des déficits de mémoire spatiale et contextuelle chez la souris (Peleg et al., 2010, Dagnas et al., 2013, Dagnas and Mons, 2013) et le rat (Bousiges et al., 2010, Zeng et al., 2011, Castellano et al., 2012).

L'analyse des résultats du premier chapitre suggère que l'altération de la phosphorylation de CREB dans le CPF apparaît être un élément crucial dans les déficits de MDT. En effet, les souris toujours alcoolisées, dont la MDT est intacte ont, en revanche, une réduction d'Ac-H4 dans le CPF et le CA1 dorsal ainsi qu'une diminution des niveaux pCREB dans le CA1 dorsal seulement.

Au sein des groupes *Sevré (1S et 6S)* et *SCLI*, des altérations de la MDT et de la phosphorylation de CREB sont observées et nos données ne montrent pas de différences majeures entre ces trois groupes. Ces résultats indiquent qu'un déficit de phosphorylation de CREB ne semble pas être spécifique au sevrage ou au stress. En effet, le sevrage à l'alcool et le protocole de SCLI affectent la même voie moléculaire. La cascade de signalisation PKA/CREB a déjà été mise en cause dans l'émergence des troubles anxieux associés au sevrage à l'alcool. En effet, les troubles anxieux durant le sevrage s'accompagnent d'une diminution de pCREB et la restauration de son niveau de phosphorylation dans l'amygdale empêche le développement des comportements de type anxieux (Pandey, 2003). Ces données renforcent l'hypothèse que CREB est un bon candidat dans l'étude de la

médiation de l'émergence des troubles de MDT et anxieux après un stress, qu'ils soient induits par un sevrage à l'alcool ou une procédure de stress chronique.

Dans la deuxième expérience, nous avons restauré la phosphorylation de CREB par une injection ip d'un inhibiteur spécifique de la PDE-IV, le rolipram, et évalué son impact sur la MDT. Le rolipram induit un effet cognitif *bidirectionnel* chez les souris *Contrôle* (perturbation) et *Sevré (1S/6S)* ou *SCLI* (facilitation) sur la MDT. En outre, le rolipram a également augmenté (chez les *Contrôle*) ou restauré un niveau normal (chez les groupes *Sevré* et *SCLI*) de phosphorylation de CREB dans le CPF, mais non dans la région dorsale du CA1. Ces résultats suggèrent fortement qu'une régulation optimale de la phosphorylation de CREB est nécessaire pour un fonctionnement normal de la MDT dans le CPF. En effet, des études ont démontré une relation en U-inversé entre le niveau de pCREB et les performances de MDT. Ainsi, le manque ou l'excès d'activation de la voie AMPc/PKA apparaît préjudiciable pour la MDT. Par exemple, notre équipe a montré que les déficits de MDT chez les souris âgées résultent d'une sur-phosphorylation de CREB dans le CPF mais pas le CA1 dorsal (Vandesquille et al., 2013). De même, la désinhibition pharmacologique de la voie de signalisation AMPc/PKA dans le CPF induit des déficits cognitifs chez la souris (Ramos et al., 2003, Runyan and Dash, 2005, Vandesquille et al., 2013).

En outre, l'augmentation de pCREB dans le CPF corrèle avec une amélioration des performances de MDT des souris *Sevré* et *SCLI* traitées avec le rolipram, ce qui suggère que l'altération de la protéine CREB contribue à l'émergence de la perturbation de la MDT et aux altérations du fonctionnement du CPF. Afin de confirmer l'implication spécifique du CPF dans l'émergence des troubles de MDT, un activateur de la PKA, le Sp-cAMPS, a été infusé directement dans le CPF ou dans la région du CA1 dorsal. Les résultats montrent que l'injection intra-CPF avant le test d'AS a un effet bidirectionnel puisqu'elle restaure les performances des souris *Sevré* mais à l'inverse altère les performances des souris *Contrôle*. En revanche, l'augmentation de l'activité de la PKA dans l'HPC n'a eu aucun effet sur les performances chez les souris *Sevré* et *Contrôle*. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent non seulement que le sevrage à l'alcool après une CCA n'affecte pas le fonctionnement du CPF et de l'HPC de la même manière et renforce également le rôle de la voie AMPc-PKA-CREB spécifiquement dans le CPF, dans la médiation des troubles de MDT induits par le sevrage.

En conclusion, nos données fournissent la preuve directe que les déficits de MDT durant le sevrage à l'alcool corrélaient avec une déficience de la phosphorylation de CREB spécifiquement dans le CPF. Les résultats ont également révélé que l'activation de la voie AMPc-PKA, en normalisant les taux de pCREB, améliore les performances de MDT des groupes *Sevré* et *SCLI*. Ces résultats pourraient avoir des implications importantes pour le développement de stratégies efficaces visant à prévenir l'impact délétère du sevrage sur les fonctions cognitives dépendantes du CPF.

Chapitre II :

Le sevrage à l'alcool induit une augmentation anormale des taux de corticostérone dans le cortex préfrontal spécifiquement

A. Introduction

Au cours de l'introduction générale, nous avons vu que le syndrome de sevrage alcoolique était fréquent au cours des premiers jours d'abstinence ou après une diminution significative de la CCA. Associés aux nombreux symptômes physiques, des troubles de l'humeur sont couramment observés durant le sevrage. En effet, la dépression est la comorbidité la plus fréquemment associée à l'alcoolisme et au sevrage ; l'étude de Weissmann et Myers (1980) montre notamment que cette pathologie s'accompagne dans 44% des cas d'une dépression majeure et dans 15% des cas d'une dépression mineure. Dans l'ensemble, les auteurs sont tous d'accord pour confirmer une aggravation des symptômes durant la phase aigue du sevrage suivit d'un effondrement de la prévalence des symptômes dépressifs après plusieurs jours.

Comme dans le cas d'une dépression sans complication de dépendance, l'une des découvertes les plus probantes pour expliquer l'émergence des troubles anxieux lors d'un sevrage à l'alcool implique une altération de l'axe corticotrope. En effet, l'injection d'antagoniste des récepteurs GR, la mifépristone, permet de réduire les comportements d'hyperexcitabilité durant la phase aigue du sevrage (Jacquot et al., 2008) et l'administration d'antagoniste de l'hormone CRF provoque une diminution des comportements de type anxieux (Baldwin et al., 1991, Rassnick et al., 1993). De plus, l'augmentation plasmatique du taux de GCs (Tabakoff et al., 1978, Adinoff et al., 1990) et les troubles anxieux sont transitoires et s'observent principalement durant la phase aigue du sevrage confortant l'hypothèse que l'augmentation de l'activité de l'axe corticotrope est responsable des troubles anxieux durant le sevrage (Roberts et al., 1992).

En dehors de leurs actions sur l'état émotionnel, les GCs sont également connus pour moduler les fonctions du CPF et de l'HPC (McEwen, 2000, Cerqueira et al., 2005, McEwen and Morrison, 2013). La MDT est ainsi particulièrement sensible à des concentrations élevées de GCs. Effectivement, l'injection de cortisol ou de corticostérone induit des troubles de MDT chez l'homme (Terfehr et al., 2011, Vaz et al., 2011) ou chez les rongeurs (Roosendaal et al., 2004). Les troubles de MDT sont également une donnée clinique courante lors d'une dépression ou d'un syndrome de Cushing, où les niveaux de cortisol sont élevés (Starkman et al., 2001, Patil et al., 2007). De plus, il a notamment été démontré que l'injection d'une seule dose de mifépristone avant le sevrage à l'alcool réduisait les troubles de mémoire (Jacquot et al., 2008).

Pourtant et en contradiction avec ce qui précède, la majorité des publications démontre une élévation transitoire du niveau de GCs (environ 1 semaine) et des déficits de MDT prolongés (plusieurs semaines à plusieurs mois). Une étude a toutefois permis d'apporter une première explication à ce désaccord, en démontrant chez le souris et le rat, que bien que l'hyper-

corticostéronémie soit transitoire dans le plasma, elle demeure prolongée (jusqu'à 2 mois) dans certaines régions cérébrales, telles que le CPF et l'HPC (Little et al., 2008). Cette observation pourrait expliquer les conséquences du sevrage à l'alcool à long terme sur la mémoire, la dépendance et la rechute.

Au vu de ces différentes observations, nous avons cherché à déterminer si les troubles de MDT des souris *Sevré* (1 ou 6 semaines) et *SCLI*, s'accompagnent de troubles anxieux et de perturbations des niveaux de corticostérone plasmatique et/ou cérébrale, en particulier dans le CPF et l'HPC dorsal.

Pour cela, nous avons dans un premier temps vérifié si notre modèle d'alcoolisation et de sevrage permettait de modéliser le caractère **transitoire** de l'hyper-corticostéronémie plasmatique et des troubles anxieux. Nous avons ensuite cherché à déterminer s'ils existent des altérations **prolongées** de l'axe corticotrope dans les structures cérébrales impliquées dans une tâche de MDT. Pour cela, le taux de corticostérone intracérébrale a été mesuré à l'aide de la technique de microdialyse.

B. Méthodologie

Expérience 1. Caractérisation de l'état physique et anxieux d'animaux alcoolisés, sevrés ou stressés.

L'état physique et le niveau d'anxiété des différents groupes ont été étudiés. Pour cela, les souris des différents groupes expérimentaux (*Contrôle* n=13, *Alcool* n=10, *Sevré 1S* n=13, *Sevré 6S* n=13 et *SCLI* n=13) ont réalisé le test du labyrinthe en croix surélevé et de la planche à neuf trous. Au préalable, nous avons contrôlé le poids et l'état du pelage des souris, de façon hebdomadaire pendant 6 semaines.

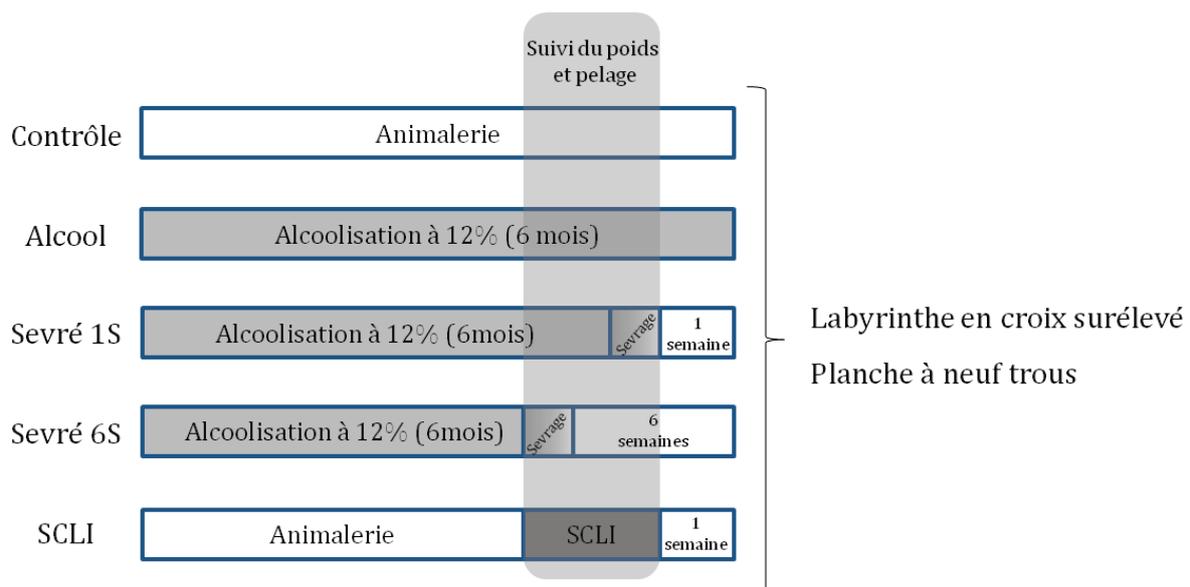


Figure 37 : composition des groupes expérimentaux et déroulement de l'expérience 1.

Les souris sont observées hebdomadairement pendant 6 semaines afin de contrôler leurs poids et l'état de leurs pelage. Les tests comportementaux sont ensuite réalisés une semaine (*Sevré 1S*) ou 6 semaines (*Sevré 6S*) après le sevrage ou 1 semaine après la fin de la procédure de stress chronique (*SCLI*). Le groupe *Alcool* continue d'être alcoolisé durant les tests comportementaux.

Expérience 2. Etude de la réactivité de l'axe corticotrope aux niveaux cérébral et plasmatique après un test de MDT.

Les effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur la réactivité de l'axe corticotrope durant une tâche de MDT ont été étudiés en dosant la corticostérone plasmatique et cérébrale, en conditions basale ou de test.

Afin de mesurer le niveau de corticostérone plasmatique, le sang a été collecté soit sur des animaux restés en animalerie (condition naïve: *Contrôle* n=10, *Alcool* n=6, *Sevré 1S* n=8, *Sevré 6S*

n=7, *SCLI* n=6) soit trente minutes après le début du test de MDT (condition test : *Contrôle* n=11, *Alcool* n=10, *Sevré 1S* n=9, *Sevré 6S* n=10, *SCLI* n=10).

Sur des groupes d'animaux indépendants, l'évolution du niveau des GCs a été mesurée dans le CPF et l'HPC dorsal par microdialyse en condition basale et pendant 2 heures après le début du test de MDT. Pour cela, des cohortes de souris ont été opérées afin d'implanter un guide sonde, 15 jours avant la microdialyse, dans le CPF (*Contrôle* n=9, *Alcool* n=8, *Sevré 1S* n=10, *Sevré 6S* n=8, *SCLI* n=7) ou dans l'HPC dorsal (*Contrôle* n=10, *Alcool* n=8, *Sevré 1S* n=8, *Sevré 6S* n=8, *SCLI* n=7). La veille de la microdialyse, les animaux sont placés dans une enceinte transparente dans la pièce contenant le labyrinthe en T et la sonde est insérée dans le CPF ou l'HPC dorsal. Le jour de la dialyse, après une phase de stabilisation de 2 heures, un échantillonnage est réalisé toutes les 15 minutes. Quatre prélèvements sont effectués, et constituent la ligne basale de la concentration de corticostérone. Le test d'AS est ensuite réalisé, pendant 20 minutes par la souris, tout en effectuant la microdialyse. La dialyse est continuée durant 2 heures après le début du test. Les échantillons prélevés durant et après le test permettent d'évaluer la réactivité de l'axe corticotrope durant l'exercice d'une tâche de MDT et le rétrocontrôle négatif. Les dialysats sont ensuite stockés à -80°C puis la corticostérone est dosée par kit ELISA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la ligne basale.

C. Résultats

Expérience 1. Le sevrage et le SCLI induisent une augmentation de l'anxiété une semaine après la procédure de stress

Mesure de l'état physique

A la première semaine d'observation, les poids des groupes expérimentaux sont différents ($F_{(4,57)}=13.75$; $p<0.001$; **Fig. 38A**). En effet, la consommation d'alcool induit une diminution du poids ($p\leq 0.006$ *Alcool, Sevré 1S et 6S vs Contrôle et SCLI*). L'analyse en mesure répétée du poids des souris au cours des 6 semaines d'observation (**Fig. 38B**) montre des différences significatives (*semaine* : $F_{(5,285)}=70.65$; $p<0.001$, *groupe* : $F_{(4,285)}=6.61$; $p<0.001$, *semaine* \times *groupe* : $F_{(20,285)}=8.89$; $p<0.001$). En effet, le poids de l'ensemble des groupes à l'exception du groupe *SCLI* augmente progressivement par rapport à leurs poids initial de la semaine 1. L'analyse post-hoc confirme cette observation ($p\leq 0.006$ *SCLI vs Contrôle, Sevré 1S et 6S*).

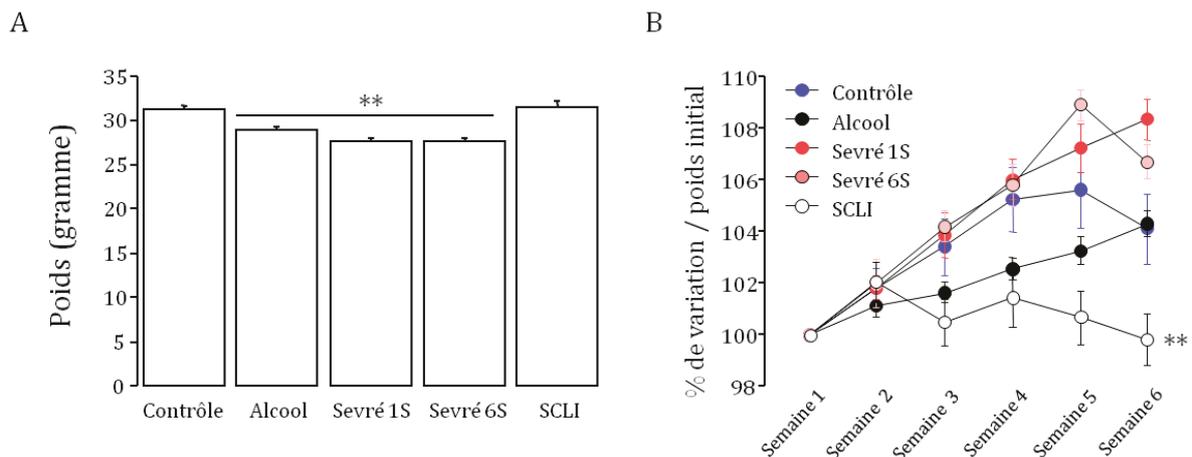


Figure 38 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le poids.

(A) Poids initial des animaux à la première semaine d'observation. Les animaux alcoolisés ont un poids inférieur aux animaux n'ayant pas consommés d'alcool (groupe *Contrôle* et *SCLI*). $**p\leq 0.006$ vs *Contrôle* et *SCLI*. (B) Evolution du poids au cours des 6 semaines d'observation. Seul le poids des souris *SCLI* n'augmente pas. $**p\leq 0.006$ vs autres groupes.

L'état du pelage (**Fig. 39**) a été évalué chez l'ensemble des animaux pendant 6 semaines. Le score total est la somme des scores obtenus à partir de sept parties du corps (voir matériel et méthode). L'analyse de la variance en mesure répétée révèle des différences significatives (*semaine* :

$F_{(5,285)}=10.13$; $p<0.001$, *groupe* : $F_{(4,285)}=8.24$; $p<0.001$, *semaine* \times *groupe* : $F_{(20,285)}=4.01$; $p<0.001$) au cours des 6 semaines d'observation. L'analyse post-hoc confirme une différence significative entre le groupe *SCLI* et les autres groupes ($p<0.001$). Plus précisément, l'état du pelage des souris *SCLI* se détériore à partir de la 4^{ème} semaine par rapport aux autres groupes (semaines 4 à 6, $p < 0,01$). En revanche, l'alcoolisation et le sevrage ne modifient pas l'état du pelage (NS).

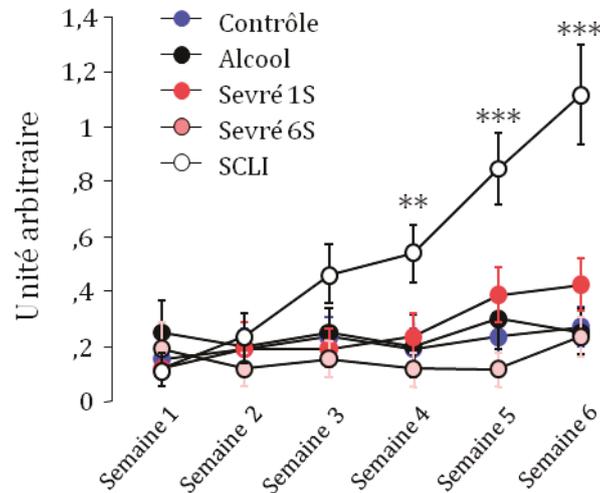


Figure 39 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'état du pelage pendant 6 semaines d'observation.

Le protocole de SCLI induit une détérioration de l'état du pelage suggérant une diminution des activités autocentrées. ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ vs autres groupes.

Test labyrinthe en croix surélevé

La **figure 40** représente les résultats des souris soumises au protocole du labyrinthe en croix surélevé précédemment décrit, afin de déterminer le profil anxieux des différents groupes. Les analyses portent sur l'index de temps et de distance parcourue dans les bras ouverts. Ces analyses indiquent une différence inter-groupes significative sur le temps ($F_{(4,57)}=5.14$; $p<0.001$) et la distance parcourue dans les bras ouverts ($F_{(4,57)}=7.91$; $p<0.001$). Plus précisément, les groupes *Sevré 1S* et *SCLI* visitent significativement moins longtemps les bras ouverts (*1S* : $p\leq 0.02$ vs *Contrôle* et *Alcool* ; *SCLI* : $p=0.001$ vs *Alcool*). De plus, l'analyse de la distance montre que les souris alcoolisées parcourent plus de distance dans les bras ouverts que les autres groupes ($p<0.004$). En revanche, l'ANOVA ne montre pas de différence significative sur la distance totale parcourue ($F_{(4,57)}=1.61$; NS).

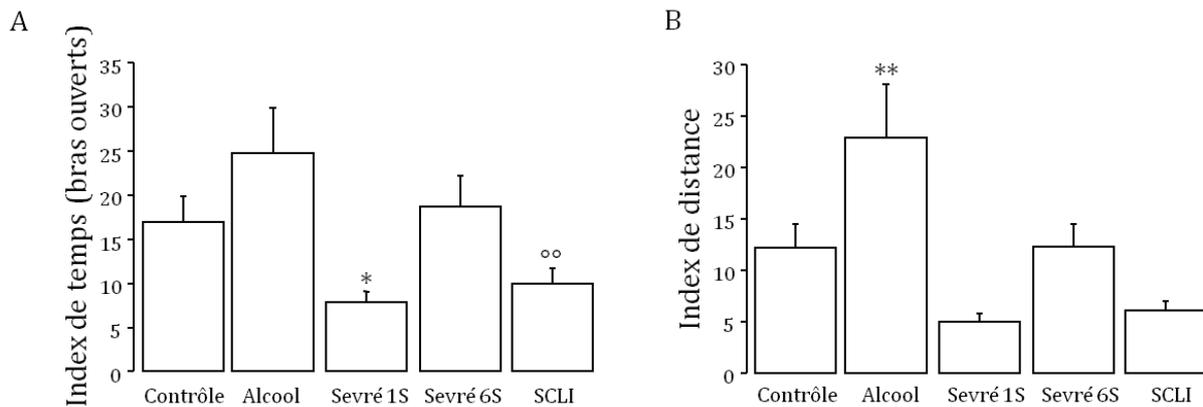


Figure 40 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur l'anxiété mesurée dans un labyrinthe en croix surélevé.

(A) Les groupes *Sevré 1S* et *SCLI* passent moins de temps dans les bras ouverts. * $p \leq 0.02$ vs *Contrôle* et *Alcool*, °° $p = 0.001$ vs *Alcool*. (B) A l'inverse, les animaux *Alcool* parcourent plus de distance dans les bras ouverts. ** $p < 0.004$ vs autres groupes.

Planche à 9 trous

Les mêmes animaux ont réalisé un test d'exploration dans une planche à neuf trous (Fig. 41). Les résultats confirment les données obtenues lors du test du labyrinthe en croix surélevé. En effet, l'ANOVA fait apparaître une différence du temps d'exploration des trous sur 10 minutes d'observation ($F_{(4,57)} = 4.6$; $p < 0.002$). Les groupes *SCLI* et *Sevré 1S* explorent moins longtemps que les autres groupes les trous situés sur le plancher de l'appareil (*SCLI* : $p < 0.008$ vs *Contrôle*, *Alcool* et *Sevré 6S*; *Sevré 1S* : $p < 0.02$ vs *Alcool* et *Sevré 6S*). Ces données sont notamment observées par l'analyse des 5 dernières minutes d'exploration ($F_{(4,57)} = 5.26$; $p < 0.001$), qui révèlent une persistance de la néophobie chez les animaux *SCLI* ($p < 0.001$ vs *Contrôle*, *Alcool* et *Sevré 6S*).

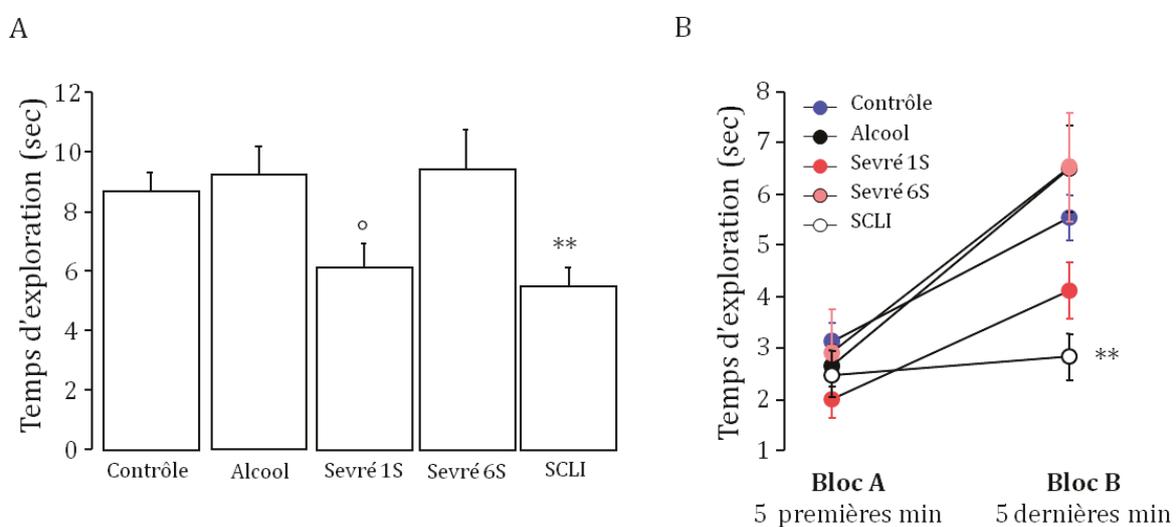


Figure 41 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le comportement exploratoire.

(A) Les souris *Sevré 1S* et *SCLI* explorent moins l'appareil. ° $P < 0.05$ vs *Alcool* et *Sevré 6S* et ** $p < 0.01$ vs *Contrôle*, *Alcool* et *Sevré 6S*. (B) La néophobie perdue au second bloc chez les animaux *SCLI*. ** $p < 0.007$ vs *Contrôle*, *Alcool* et *Sevré 1S*.

Conclusion : les données montrent que le protocole de SCLI et le sevrage à l'alcool induisent un comportement de type « anxieux ». De plus, en accord avec les données cliniques, l'anxiété induite par le sevrage est transitoire (groupe *Sevré IS* mais pas *6S*).

Expérience 2. Elévation de la concentration de corticostérone dans le CPF chez les souris *Sevré* et *SCLI*.

Test d'alternance spontanée

Les résultats comportementaux (**Fig. 42A**) confirment les résultats du chapitre 1 et indiquent que les groupes *Contrôle* et *Alcool* alternent significativement au-dessus du hasard ($75.44 \pm 3.46\%$; $t(18)=6.02$, $p<0.001$ et $75.00 \pm 4.54\%$; $t(13)=5.51$, $p<0.001$ respectivement). En revanche, les deux groupes *Sevré IS/6S* et le groupe *SCLI* répondent au hasard (*IS*: $53.70 \pm 3.70\%$, $t(17)= 1.0$, NS ; *6S*: $55.21 \pm 4.49\%$, $t(15)= 1.16$, NS ; *SCLI*: $53.57 \pm 4.34\%$, $t(13)= 0.8$, NS). L'analyse ANOVA révèle un effet *groupe* significatif ($F_{(4,76)}=8.15$, $p<0.001$) confirmé par l'analyse post hoc au sein des groupes *Sevré IS/6S* et *SCLI* en comparaison aux groupes *Contrôle* et *Alcool* ($p<0.001$ pour toutes les comparaisons).

Au cours des 7 essais, la latence de choix n'est pas significativement différente entre les groupes quel que soit le facteur considéré (**Fig. 42C**, $p>0.05$ pour toutes les comparaisons). Les taux d'alternance sur le dernier essai (8^{ème} essai) évalué avec un IEE de 5 secondes sont comparables et élevés (plus de 72%) pour tous les groupes ($F_{(4,76)}=0.2$; NS) démontrant que la motivation à alterner n'est pas altérée (**Fig. 42D**).

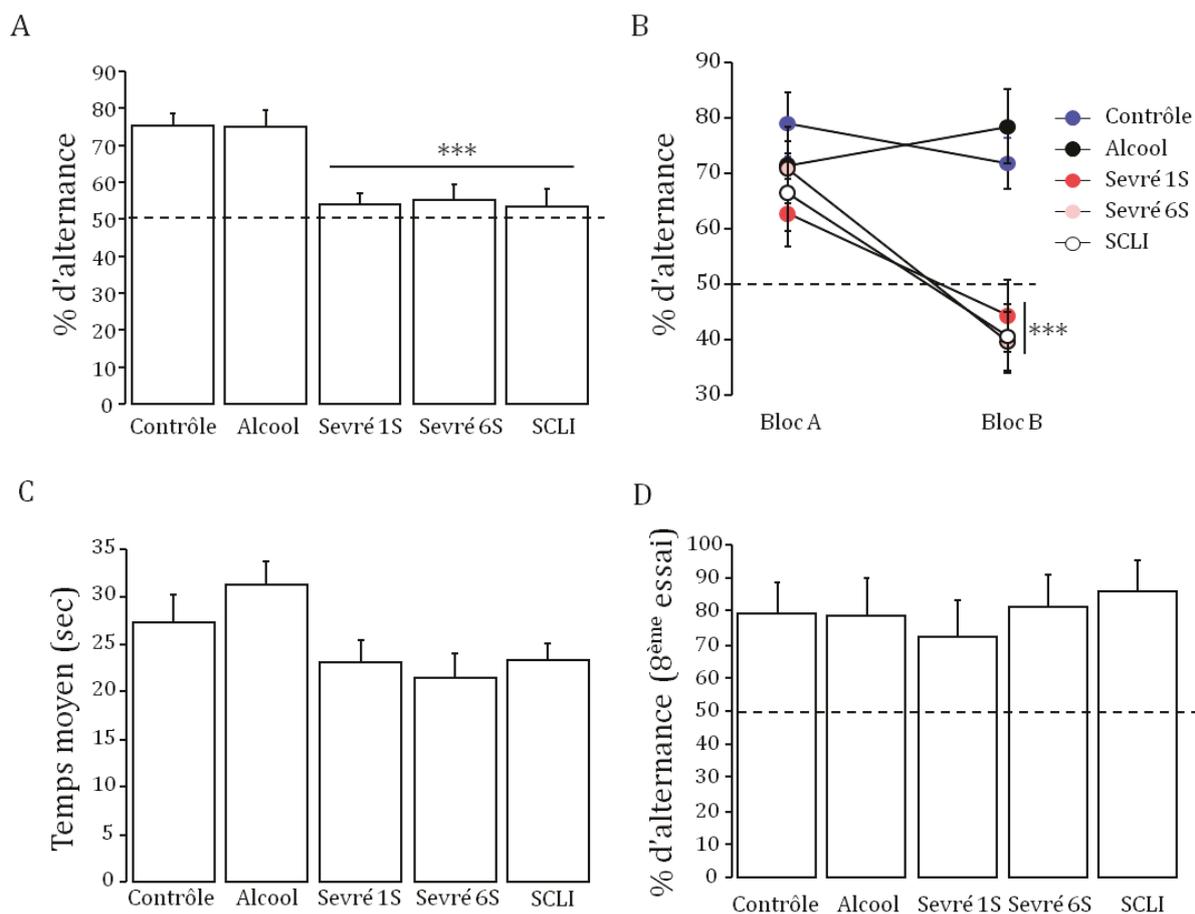


Figure 42 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur le modèle d'AS durant la microdialyse. **(A)** Les souris *Sevré* et *SCLI* présentent de graves troubles de la MDT. *** $p < 0.001$ vs *Contrôle* et *Alcool*. **(B)** Les souris *Sevré* et *SCLI* alternent au premier bloc d'essai (essais 2,3 et 4) mais pas au second bloc (essais 5, 6 et 7). *** $p < 0.001$ vs *Contrôle* et *Alcool*. **(C)** Le temps moyen de latence choix de diffère pas entre les groupes. **(D)** Les groupes ont un niveau d'alternance semblable au 8^{ème} essai avec un IEE de 5sec.

Corticostérone plasmatique dosage.

La concentration de corticostérone **totale** a été mesurée en conditions naïve (**Fig. 43A**) et test (**Fig. 43B**). L'ANOVA révèle une différence significative entre les groupes en conditions naïve ($F_{(4,32)}=9.46$; $p < 0.001$) et test ($F_{(4,45)}=5.26$; $p < 0.001$). Plus précisément, en condition naïve, le groupe *SCLI* présente un taux de corticostérone plus élevé que les autres groupes ($p < 0.001$). Le test de MDT induit une augmentation de la concentration de corticostérone dans tous les groupes ($p < 0.001$ vs groupes naïfs respectifs), mais qui est plus accentuée chez les *Sevré 1S* par rapport aux groupes *Contrôle*, et *Sevré 6S* ($p \leq 0.003$) ; on note aussi que la concentration en corticostérone après le test est plus élevée chez les souris *SCLI* par rapport au *Contrôle* ($p = 0.002$).

La concentration de la corticostérone **libre** plasmatique, en condition test, a également été dosée et les résultats révèlent un effet *groupe* significatif ($F_{(4,45)}=4.09$; $p < 0.006$). Le taux de corticostérone libre est plus élevé au sein des groupes *Sevré 1S* ($p \leq 0.01$ par rapport aux groupes *Contrôle*, et *Sevré 6S*) et *SCLI* ($p = 0.026$ par rapport au groupe *Contrôle*).

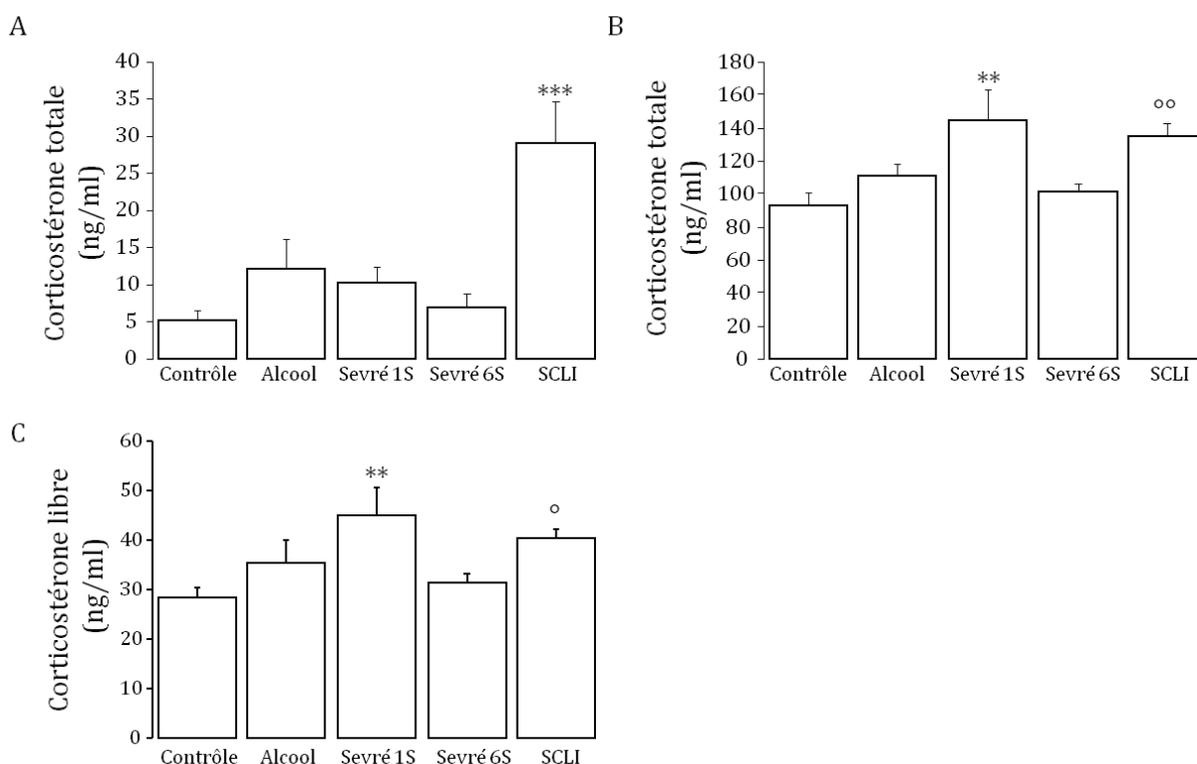


Figure 43 : concentration de la corticostérone plasmatique totale et libre.

(A) En condition basale, le stress chronique provoque une augmentation du niveau de corticostérone totale (ng/ml). *** $p < 0.001$ vs autres groupes. (B) En condition test, la concentration en corticostérone totale est plus élevée chez les souris *Sevré 1S* et *SCLI*. ** $p < 0.01$ vs *Contrôle* et *Sevré 6S* et $^{\circ}p < 0.01$ vs *Contrôle*. (C) Le test d'AS induit une plus grande augmentation du taux de corticostérone libre au niveau plasmatique, au sein des groupes *Sevré 1S* et *SCLI*. ** $p < 0.01$ vs *Contrôle* et *Sevré 6S* et $^{\circ}p < 0.05$ vs *Contrôle*.

Taux de corticostérone intracérébrale

Les illustrations des contrôles histologiques permettant de vérifier l'emplacement des sondes de microdialyse dans le CPF et dans l'HPC dorsal sont représentées **figures 44A** et **44B** respectivement. Les résultats indiquent que les concentrations absolues des taux de corticostérone basales (moyenne à partir de quatre points mesurés avant le test de MDT en ng/ml) sont significativement différentes entre les groupes dans le CPF (**Fig. 44C**) $F_{(4,36)}=2.56$; $p=0.05$, (*Contrôle*: 0.244 ± 0.03 ; *Alcool*: 0.359 ± 0.03 ; *Sevré 1S*: 0.191 ± 0.03 ; *Sevré 6S*: 0.257 ± 0.04 et *SCLI*: 0.205 ± 0.07), mais pas dans l'HPC dorsal (**Fig. 44D**), $F_{(4,35)}=2.1$; NS, (*Contrôle*: 0.186 ± 0.02 ; *Alcool*: 0.212 ± 0.06 ; *Sevré 1S*: 0.256 ± 0.04 ; *Sevré 6S*: 0.125 ± 0.01 et *SCLI*: 0.156 ± 0.02). L'analyse post-hoc confirme que dans le CPF le niveau basal de corticostérone est élevé au sein du groupe *Alcool* par rapport au groupe *Sevré 1S* ($p=0.005$).

L'analyse ANOVA en mesures répétées réalisée sur l'évolution de la corticostérone au cours du temps témoigne de différences significatives entre les groupes dans le CPF ($F_{(4,396)}=4.93$; $p=0.003$), mais non dans l'HPC dorsal ($F_{(4,385)}=0.68$; NS). De plus, dans les deux structures, le test induit l'augmentation du taux de corticostérone (CPF: ($F_{(11,396)}=23.22$; $p < 0.001$; HPC dorsal: ($F_{(11,385)}=22.46$;

$p < 0.001$), sans effet significatif sur l'interaction des facteurs *groupe* x *temps* (CPF : $F_{(4,396)} = 1.27$; NS; HPC dorsal : $(F_{(4,385)} = 0.73$; NS).

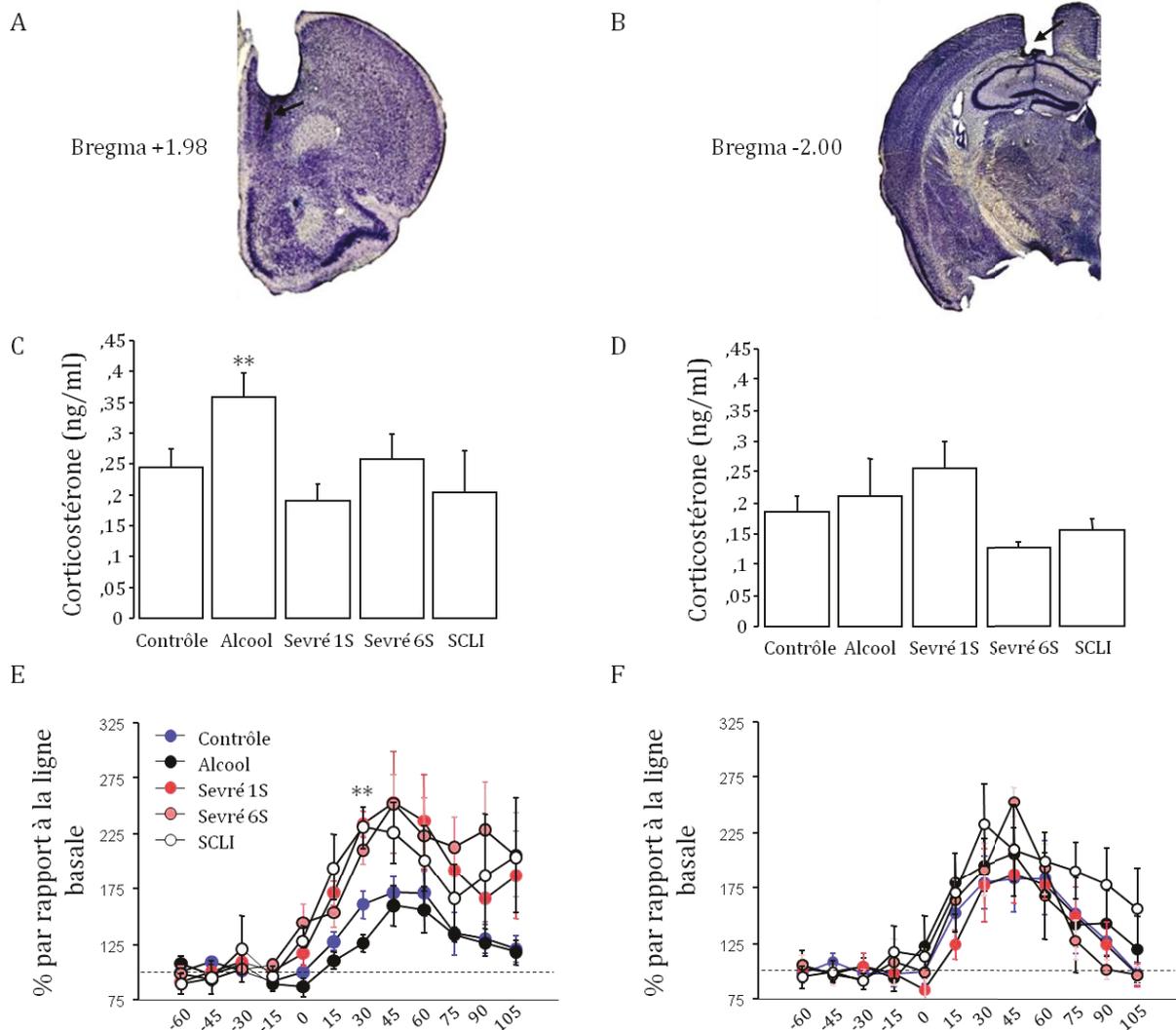


Figure 44 : effets de l'alcoolisation, du sevrage et du SCLI sur la concentration basale de corticostérone et sur la réactivité de l'axe corticotrope dans le CPF et l'HPC dorsal après un test de MDT.

Illustrations de l'emplacement des sondes de dialyse dans le CPF (A) et dans l'HPC dorsal (B). (C) Le taux basal de corticostérone (ng/ml) dans le CPF est plus élevé chez les animaux *Alcool*. ** $p < 0.01$ vs *Sevré 1S*. (D) Dans l'HPC dorsal, la concentration en corticostérone (ng/ml) est comparable entre les groupes. (E) Le test induit une élévation des concentrations de corticostérone dans le CPF au sein de l'ensemble des groupes mais qui est plus accentuée chez les groupes *Sevré 1S/6S* et *SCLI*. ** $p < 0.01$ vs *Contrôle* et *Alcool*. (F) Dans l'HPC dorsal, le test induit une augmentation comparable du taux de corticostérone par rapport à la ligne basale au sein de tous les groupes.

Dans le CPF (Fig. 44E), le test induit une augmentation progressive de la concentration de corticostérone de 15 à 60 minutes par rapport à la moyenne basale avec un maximum à 60 minutes au sein du groupe *Contrôle* ($171.33 \pm 20.85\%$, $p = 0.009$). Chez les souris *Alcool*, l'augmentation induite par le test est comparable au groupe *Contrôle* et s'observe de 30 minutes jusqu'à 75 minutes avec un maximum au point 45 minutes ($159.69 \pm 18.28\%$, $p = 0.017$ par rapport à la ligne basale). A l'inverse, chez les groupes *Sevré 1S* et *6S*, la hausse de corticostérone induite par le test est précoce, prolongée et

accentuée de 15 à 105 minutes par rapport à la moyenne basale avec un maximum mesuré à 45 minutes (*IS*: 253.32±46.12%, $p=0.009$; *6S*: 252.72±25.74%, $p<0.001$). L'analyse de la cinétique de corticostérone au sein du groupe *SCLI* indique également que l'augmentation du taux de corticostérone est précoce et accentuée (de la 15^{ème} à 75^{ème} minutes avec un maximum au point 30 : 230.76 ± 19.36%, $p<0.001$ par rapport à la ligne basale).

En outre, l'analyse limitée aux points 15 minutes ($F_{(4,36)}=4.5$; $p<0.004$) et 30 minutes dans le CPF ($F_{(4,36)}=12.50$; $p<0.001$) (points qui correspondent à la période de test) a montré une différence significative des concentrations de corticostérone entre les groupes. Plus précisément, à 30 minutes les groupes *Sevrés IS/6S* et *SCLI* présentent une augmentation significative de la corticostérone par rapport aux groupes *Contrôle* et *Alcool* ($p<0.01$ dans toutes les comparaisons).

L'effet *structure* a également été analysé sur l'évolution du taux de corticostérone afin de déterminer si l'augmentation induite par le test est différente entre le CPF et l'HPC dorsal, au sein de chaque groupe. Il en résulte que l'évolution de la corticostérone dans le CPF et l'HPC dorsal au sein des groupes *Sevré IS* et *6S* est significativement différente d'une structure à l'autre. En effet, les ANOVA certifient d'un effet *structure* au sein des groupes *Sevré IS* ($F_{(1,176)}=12.44$; $p<0.003$) et *Sevré 6S* ($F_{(11,154)}=3.5$; $p<0.04$). Ces résultats témoignent que l'augmentation excessive du taux de corticostérone est spécifique au CPF au sein des groupes *Sevré*. En revanche, l'évolution du taux de corticostérone est similaire entre le CPF et l'HPC dorsal, au sein des groupes *Contrôle*, *Alcool* et *SCLI*. Ces données démontrent qu'à l'inverse des groupes *Sevré (IS/6S)*, l'augmentation excessive du taux de corticostérone est examinée dans le CPF et l'HPC dorsal au sein du groupe *SCLI*.

En résumé, ces données montrent que les groupes présentant des troubles de la MDT ont également une élévation du taux de corticostérone accentuée dans le CPF.

D. Discussion

Dans ce deuxième chapitre, nous avons cherché à caractériser les troubles anxieux et les perturbations de l'axe corticotrope induits par un sevrage en condition basale et durant un test de MDT, aux niveaux plasmatique et cérébral. De plus, nous avons cherché à dissocier les perturbations transitoires, des perturbations durables induites par le sevrage à l'alcool.

Deux mesures ont été utilisées pour évaluer l'état physique de l'animal : l'état du pelage et le poids. Chez les rongeurs, le toilettage est un aspect important de leurs répertoire comportemental (Berridge et al., 1987, Berridge and Whishaw, 1992, Kalueff and Tuohimaa, 2004a) et ce comportement est particulièrement sensible au stress (Kametani, 1988, Kalueff and Tuohimaa, 2004b). Le stress induit une diminution du comportement de toilettage ainsi l'évaluation de l'état du pelage permet de mesurer indirectement la qualité du toilettage et l'effet du stress sur l'état physique. Cette donnée permet de modéliser la difficulté des personnes atteintes de dépression à réaliser des tâches simples conduisant notamment à une mauvaise hygiène. Le poids des souris a également été mesuré car des variations du poids (perte ou gain) est l'un des signes majeurs de la dépression d'après le DSM-IV.

Les données obtenues confirment que le protocole de SCLI induit une détérioration de l'état du pelage à partir de la 4^{ème} semaine et une absence de prise de poids au cours des 6 semaines d'observation par rapport au groupe *Contrôle*. En revanche, les souris *Alcool* et *Sevré 1S/6S* ne présentent pas de différence significative avec les *Contrôle*. L'absence d'effet du sevrage sur l'état du pelage et sur le poids peut être attribuable à la différence de durée des stress (6 semaines vs plusieurs jours). En effet, ces altérations ont mis plusieurs semaines à se manifester au sein du groupe *SCLI*. La latence d'apparition de l'effet du stress sur la détérioration de l'état du pelage et le faible score de détérioration au sein du groupe *SCLI* peuvent être dûs au fait que la souche C57Bl/6 est peu sensible à l'effet du stress sur le pelage induit par le protocole de SCLI par rapport à d'autre souche comme les souris BALB/c ou DBA/2 (Pothion et al., 2004, Surget et Belzung, 2009). Dans l'ensemble, ces premiers résultats permettent de confirmer une analogie entre le modèle de SCLI et la dépression humaine mais ne montrent pas d'effet du sevrage sur l'état physique des souris.

Dans une deuxième série d'expérience et en accord avec de précédentes études, nous confirmons que le sevrage et le protocole de SCLI induisent des comportements de type anxieux dans les tests du labyrinthe en croix surélevé et de la planche à neuf trous. En effet, une réduction du temps passé dans le bras ouvert dans le labyrinthe en croix surélevé et une persistance de la néophobie dans le test de la planche à 9 trous sont mesurées au sein des groupes *Sevré 1S* et *SCLI* par rapport aux souris *Contrôle*. L'augmentation de l'anxiété est une conséquence directe du sevrage puisque aucun

trouble anxieux n'est apparent au sein du groupe *Alcool*. Cependant, le sevrage induit une augmentation de l'anxiété transitoire puisque les troubles anxieux ne sont observables qu'au sein du groupe *Sevré 1S* mais non chez les souris sevrées depuis 6 semaines. Ces observations sont en accord avec les résultats de précédentes études chez les rongeurs montrant une réduction du temps passé dans les bras ouverts dans la semaine qui suit le sevrage à l'alcool (Onaivi et al., 1989, Prather et al., 1991, Lal et al., 1993) et une disparition de ce comportement après 6 semaines de sevrage (Valdez et al., 2002). Ainsi, ce modèle a permis de reproduire le caractère **transitoire** des troubles anxieux observés chez l'homme.

Dans une troisième partie de l'étude, nous avons examiné la réactivité de l'axe corticotrope aux niveaux plasmatique et central. En condition basale, le niveau de corticostérone plasmatique a été mesuré. Les résultats indiquent que seul le protocole de *SCLI* induit une augmentation de la concentration de corticostérone plasmatique. En revanche, l'alcoolisation et le sevrage n'ont pas d'effet sur le taux plasmatique de corticostérone en condition basale.

Cependant, la réactivité de l'axe corticotrope est perturbée en début de sevrage (*Sevré 1S*) avant de se rétablir de façon spontanée après un sevrage prolongé (*Sevré 6S*). En effet, le test de MDT induit une plus forte augmentation des taux de corticostérone plasmatique totale et libre dans les groupes *Sevré 1S* et *SCLI* par rapport au groupe *Contrôle* mais non au sein des groupes *Alcool* et *Sevré 6S*. De façon comparable, les données obtenues chez l'homme renforcent ces résultats puisque la phase aiguë du sevrage s'accompagne d'une hyper réactivité de l'axe corticotrope suivie d'un rétablissement de la réactivité de l'axe corticotrope (Munro et al., 2005), voir même d'une hyporéactivité dans certain cas (Majumdar et al., 1989, Esel et al., 2001, Keedwell et al., 2001).

Au niveau cérébral, les résultats de microdialyse confirment une plus forte élévation du taux de corticostérone. Étonnamment, chez les souris *Sevré 1S*, la forte élévation du taux de corticostérone intracérébrale n'est observée que dans le CPF. De plus, la forte élévation de corticostérone spécifique au CPF est également présente chez les souris *Sevré 6S* alors que les taux plasmatique sont comparable aux *Contrôle*. Ces résultats mettent en évidence de graves perturbations de la régulation de l'axe corticotrope au sein des groupes *Sevré* et mettent en lumière une altération durable et spécifique du CPF, une structure décrite pour être particulièrement sensible à l'effet du sevrage et aux GCs.

Des différences régionales des taux de corticostérone ont déjà été décrites après un sevrage à l'alcool, bien que la corticostérone provienne de la circulation générale. L'étude de Little en 2008, révèle notamment une dissociation durable (au moins 2 mois) entre les taux de corticostérone périphériques et centraux après une longue période d'alcoolisation (8 mois) chez le rat. En accord avec nos résultats, il montre que le sevrage s'accompagne d'une augmentation **transitoire** du taux plasmatique de corticostérone alors que l'hyper-corticostéronémie est durable dans certaines régions spécifiques du cerveau dont le CPF. Une des hypothèses les plus probables serait l'existence d'une synthèse locale de GCs dans des tissus autres que les glandes surrénales (Davies and MacKenzie, 2003). Cette hypothèse suggère que les 11-bêta-hydroxystéroïde-déshydrogénase-1 (HSD-1) localisés

en particulier, dans le CPF (Moisan et al., 1990, Sakai et al., 1992, Seckl and Walker, 2001) réactiverait la corticostérone à partir de la 11-déhydrocorticostérone inactive et pourrait moduler localement l'action des GCs dans le CPF. De plus, le traitement à l'éthanol et le sevrage diminuent les taux de protéine GR dans les régions corticales et hippocampiques de manière significative et hétérogène. En effet, alors que la réduction de GR est normalisée au cours du sevrage dans l'HPC, elle est maintenue dans le CPF après le sevrage (Roy et al., 2002). Le maintien de la diminution du taux de protéine GR pourrait être secondaire aux taux élevés de GCs durant la période aiguë du sevrage (Okret et al., 1986, Rosewicz et al., 1988) et leur réduction dans les structures corticales pourrait engendrer une perturbation de la balance MR/GR entraînant l'émergence de troubles cognitifs.

En revanche, cette hétérogénéité entre les taux de corticostérone intracérébrale n'est pas retrouvée au sein du groupe *SCLI*, démontrant un effet spécifique de l'alcoolisation et du sevrage sur le CPF. En effet, même si aucune différence statistique significative entre les groupes dans l'HPC dorsal n'émerge, les résultats ne montrent pas d'effet structure au sein du groupe *SCLI*, ce qui n'est pas le cas au sein des groupes *Sevré IS/6S* où les perturbations sont spécifiquement localisées au CPF. De plus, et à l'inverse des groupes *Sevré* un déficit de rétrocontrôle négatif est observé dans les deux structures, ce qui constitue un marqueur majeur de la dépression au niveau neuroendocrinien (Parker et al., 2003, Raison and Miller, 2003, Merali et al., 2004, Burke et al., 2005).

Associés aux perturbations de l'axe corticotrope, nos résultats confirment la présence des déficits de MDT dans le test d'AS alors que les souris sont microdialysées. Comme pour le chapitre 1, les données montrent que le sevrage et le protocole de *SCLI* provoquent une augmentation de la vulnérabilité aux interférences proactives au cours d'une série d'essai. De plus, les résultats montrent que la procédure de microdialyse n'affecte pas les performances des animaux.

Pour conclure, nos résultats sont en accord avec les données cliniques obtenues chez l'homme permettant d'apporter une validité théorique et phénoménologique à notre modèle de sevrage. En effet, notre modèle de sevrage a permis de reproduire le caractère transitoire des troubles anxieux et des perturbations plasmatiques des niveaux de GCs ainsi que le caractère durable des troubles de la MDT. Nos résultats mettent également en évidence une altération prolongée des taux de corticostérone spécifique au CPF durant un test de MDT.

Chapitre III :

Le sevrage à l'alcool perturbe la mémoire de travail via l'action délétère de la corticostérone sur pCREB

A. Introduction

Nous avons montré précédemment que le test d'AS induit une élévation excessive du niveau de corticostérone dans le CPF, particulièrement 30 minutes après le début du test. A ce même délai, nous avons également constaté dans le premier chapitre que les déficits de MDT des animaux *Sevré* et *SCLI* s'accompagnent d'un déficit de la phosphorylation de CREB, reflétant une diminution de l'activité cérébrale, par rapport au groupe *Contrôle*. **L'ensemble de ces résultats montre que lors d'un sevrage à l'alcool, le CPF joue un rôle prédominant dans les troubles de la MDT et suggère que les GCs et CREB pourraient être impliqués dans une même voie de signalisation à l'origine de l'émergence et du maintien des déficits de MDT.**

Ainsi, dans ce troisième chapitre, nous nous efforcerons de déterminer s'il existe une relation causale entre l'importante augmentation du taux de corticostérone induite par le test d'AS et le déficit de phosphorylation de CREB dans le CPF chez les souris sevrées et *SCLI*. Nous avons, ainsi, dans une première expérience, vérifié si des modifications du niveau de pCREB peuvent induire des variations du taux de corticostérone pour des délais cohérents avec ceux du test d'AS. Pour cela, des souris ont reçu du rolipram puis le niveau d'anxiété et les concentrations plasmatiques de corticostérone ont été mesurés. Les effets des GCs sur la MDT et la phosphorylation de CREB ont ensuite été analysés grâce à l'augmentation pharmacologique du taux de corticostérone au sein des animaux *Contrôle* ou, à l'inverse via l'inhibition de la synthèse de corticostérone chez les souris *Sevré* et *SCLI*. Enfin, dans une dernière expérience, nous avons déterminé les implications relatives des récepteurs (MR vs GR) et des structures (CPF vs HPC dorsal), dans l'émergence des troubles de MDT chez les souris *Sevré*, à l'aide d'administrations in situ d'antagonistes spécifiques (spironolactone et mifepristone).

B. Méthodologie

Expérience 1. Effets du rolipram sur l'anxiété et les taux de corticostérone plasmatique.

Dans cette première expérience nous avons cherché à déterminer si le rolipram peut modifier le taux de corticostérone plasmatique et le niveau d'anxiété au sein de nos différents groupes expérimentaux. Pour cela une cohorte de souris a été traitée avec du rolipram à une dose de 0.1mg/kg (*Contrôle* n=10, *Sevré 1S* n=11, *Sevré 6S* n=11 et *SCLI* n=10) ou avec le solvant (*Contrôle* n=10, *Sevré 1S* n=11, *Sevré 6S* n=10 et *SCLI* n=10), 30 minutes avant le début du test du labyrinthe en croix surélevé, permettant de mesurer le niveau d'anxiété des souris. Trente minutes après le début du test, les souris sont anesthésiées afin de prélever le sang et doser la corticostérone plasmatique.

Expérience 2. Effets de l'injection de corticostérone sur la MDT et pCREB chez le groupe Contrôle.

Pour tester si l'augmentation de la corticostérone induit des troubles de MDT et de pCREB, nous avons comparé les performances des souris *Contrôle* traitées soit après injection ip aigue de corticostérone (n=7) soit de solvant (n=9). Le traitement est administré 30 minutes avant le test de MDT. Les souris ont ensuite été sacrifiées pour collecter le sang afin de mesurer le niveau de corticostérone plasmatique et réaliser l'immunohistochimie de pCREB. En parallèle, le sang et les cerveaux d'animaux en condition naïve ont également été prélevés sur des groupes indépendants (n=3 par groupe).

Expérience 3. Effets de l'injection d'un inhibiteur de la synthèse de corticostérone, la métyrapone, sur la MDT et pCREB chez les groupes Sevré ou SCLI.

Dans le but de vérifier l'hypothèse que les taux excessifs de corticostérone au sein des groupes *Sevré* et *SCLI* pourraient être à l'origine des perturbations de la MDT et de pCREB, nous avons inhibé la synthèse de corticostérone. Pour cela, des souris (*Contrôle* n=7, *Sevré 1S* n=8, *Sevré 6S* n=8 et *SCLI* n=8) ont reçu une injection ip aigue de métyrapone (35mg/kg), 30 minutes avant le début du test de MDT. Ces animaux ont été comparés à des animaux ayant reçu des injections de solvant (*Contrôle* n=11, *Sevré 1S* n=8, *Sevré 6S* n=8 et *SCLI* n=7). Les souris testées et naïves (n=4 ou 5 par groupe) ont été sacrifiées afin de récupérer le sang et le cerveau pour le dosage de corticostérone plasmatique et l'immunohistochimie de pCREB.

Expérience 4. Effets du blocage des récepteurs MR ou GR dans le cortex préfrontal chez les souris Sevré IS

L'implication des récepteurs MR et GR dans le CPF dans l'émergence des déficits de MDT induits par le sevrage a ensuite été étudiée. Pour cela, des guides canules ont été implantés au dessus du CPF ou au dessus du CA1 dorsal, 15 jours avant le début du test d'AS afin d'injecter soit un antagoniste des récepteurs GR, le Mifepristone (CPF : *Sevré IS* n=10 ; CA1: *Sevré IS* n=10), soit un antagoniste des récepteurs MR, le Spironolactone (CPF : *Sevré IS* n=10 ; CA1 : *Sevré IS* n=10), soit du LCRa (CPF : *Contrôle* n=9, *Sevré IS* n=12 ; CA1 : *Contrôle* n=9, *Sevré IS* n=11). Les injections sont réalisées 15 minutes avant le début du test d'AS soit à un débit de 0.1µl/minute pendant 2,5 minutes dans le CPF soit à un débit de 0.25µl/minute pendant 2,5 minutes dans l'HPC dorsal. Les animaux ont ensuite été sacrifiés afin de réaliser les contrôles histologiques.

C. Résultats

Expérience 1. Le rolipram diminue l'anxiété des groupes *Sevré IS* et *SCLI*

Labyrinthe en croix surélevé

Afin de tester l'effet du rolipram sur l'anxiété des souris ont réalisé le test du labyrinthe en croix surélevé 30 minutes après une injection de solvant ou de rolipram (**Fig. 45A et B**). Au regard des animaux traités avec le solvant, les résultats de l'index de temps et de distance parcourue dans les bras ouverts indiquent un effet *groupe* (Temps : $F_{(3,37)}=3.71$, $p<0.01$; Distance : $F_{(3,37)}=3.40$, $p<0.027$). Les souris *SCLI* passent significativement moins de temps et parcourent moins de distance dans les bras ouverts que les souris *Contrôle* (Temps : $p=0.007$; Distance : $p=0.004$) et *Sevré 6S* (Temps : $p=0.01$; Distance : $p=0.02$).

En revanche, l'injection de rolipram réduit les différences entre les groupes, aucune différence n'étant observée sur les paramètres temps ($F_{(3,38)}=0.11$, NS) et distance parcourue dans les bras ouverts ($F_{(3,38)}=0.23$, NS), au sein des groupes traités avec le rolipram.

L'analyse centrée sur l'effet *traitement* confirme des différences significatives entre les souris traitées avec le rolipram et celles traitées avec le solvant au sein des groupes *Sevré IS* (Temps : $F_{(1,20)}=6.94$, $p<0.016$) et *SCLI* (Temps : $F_{(1,18)}=13.6$, $p<0.017$; Distance : $F_{(1,18)}=6.29$, $p<0.02$) qui passent moins de temps dans les bras ouverts.

Corticostérone plasmatique

Les concentrations de corticostérone ont également été analysées (**Fig. 45C**) après le test du labyrinthe en croix surélevé. L'ANOVA révèle un effet *groupe* significatif ($F_{(3,75)}=6.25$; $p<0.001$) ainsi qu'un effet *traitement* ($F_{(1,75)}=9.31$; $p<0.003$). Plus précisément, au sein des souris solvant, l'analyse ANOVA montre un effet *groupe* ($F_{(3,75)}=4.83$; $p<0.006$) confirmé par l'analyse post-hoc montrant que les taux de corticostérone sont plus faibles chez les animaux *Contrôle* que chez les groupes *Sevré IS/6S* et *SCLI* ($p<0.005$ pour toutes les comparaisons). De plus, le traitement au rolipram induit une augmentation significative du taux de corticostérone chez les animaux *Contrôle* ($p=0.001$ solvant vs rolipram).

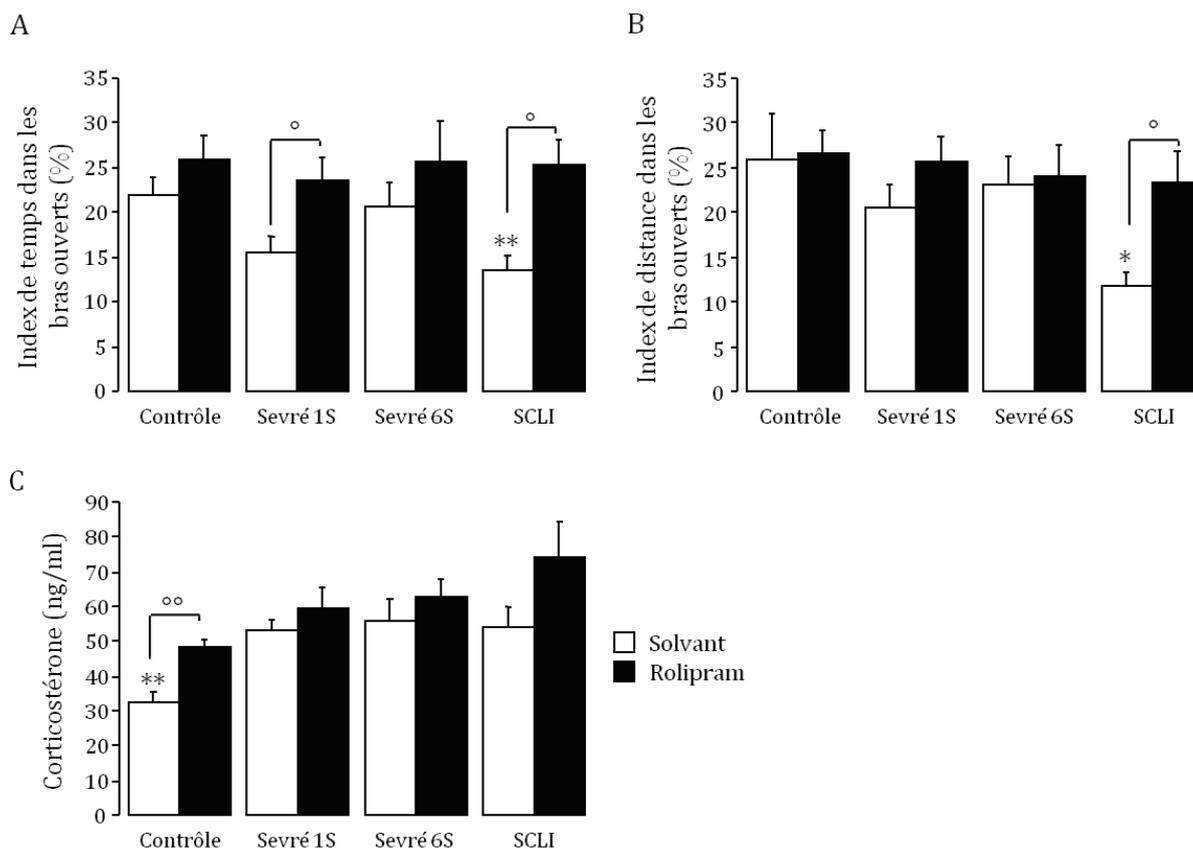


Figure 45 : effets du rolipram sur l'anxiété.

Chez les animaux *Sevré 1S* et *SCLI*, le rolipram augmente le pourcentage de temps (A) et de distance (B) passé dans les bras ouverts. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs *Contrôle* et *Sevré 6S*, ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$ vs solvant. (C) Le rolipram augmente le taux de corticostérone des souris *Contrôle*. ** $p < 0.01$ vs autres, °° $p < 0.01$ vs solvant.

Conclusion : L'activation de la voie AMPc/ PKA/CREB par l'injection de rolipram permet de diminuer l'anxiété des souris *Sevré 1S* et *SCLI*, sans diminuer les taux de corticostérone plasmatique.

Expérience 2. L'augmentation pharmacologique de la corticostérone chez le groupe *Contrôle* perturbe la MDT et réduit pCREB

Corticostérone plasmatique

L'injection induit une forte élévation de la concentration de corticostérone mesurée en conditions basale et test (Fig. 46A). Plus précisément, l'analyse ANOVA montre un effet du *traitement* en condition basale ($F_{(1,4)}=81.3$, $p < 0.001$, solvant : 24.9 ± 10.9 ng/ml; Corticostérone : 264.7 ± 24.23 ng/ml) et en condition test ($F_{(1,14)}=410.63$, $p < 0.001$, solvant : 100.2 ± 5.8 ng/ml; Corticostérone : 306.7 ± 8.8 ng/ml). En outre, l'analyse des résultats montre un effet significatif du test au sein du groupe solvant ($F_{(1,10)}=40.5$, $p < 0.001$), mais non au sein du groupe corticostérone ($F_{(1,8)}=4.4$; NS).

Test d'alternance spontanée

Comme illustré sur la **figure 46B**, le pourcentage d'alternance est significativement au dessus du hasard seulement pour les souris solvant (solvant : $70.37 \pm 3.7\%$; $t(8) = 5.5$, $p < 0.001$; Corticostérone : $54.76 \pm 6.0\%$; $t(8) = 0.79$, $p = \text{NS}$). La corticostérone réduit les performances de MDT ce qui est confirmé par l'analyse factorielle ANOVA ($F_{(1,14)} = 5.38$, $p = 0.03$). Cependant, la motivation à alterner au cours de la série n'est pas altérée, dans la mesure où on observe aucune différence significative au 8^{ème} essai de la série entre les groupes ($F_{(1,14)} = 2.13$; NS). De plus, la latence de choix n'est pas significativement différente entre les groupes (NS, données non représentées).

Phosphorylation de CREB

Condition naïve : l'injection de corticostérone n'a pas d'effet sur le niveau de pCREB basal dans le CPF et le CA1 dorsal (NS pour les deux comparaisons, données non représentées).

Condition test : L'analyse de variance montre une réduction significative des niveaux de pCREB dans le CPF ($F_{(1,14)} = 10.0$, $p = 0.006$) chez les souris traitées avec la corticostérone (solvant : $375.2 \pm 81.9\%$; Corticostérone : $71.3 \pm 13.9\%$). En revanche, l'injection de corticostérone n'a pas d'effet significatif sur pCREB dans le CA1 dorsal ($F_{(1,14)} = 4.33$, $p = \text{NS}$). Ces données montrent que des taux élevés de corticostérone induisent des déficits de MDT via l'inhibition pCREB dans le CPF.

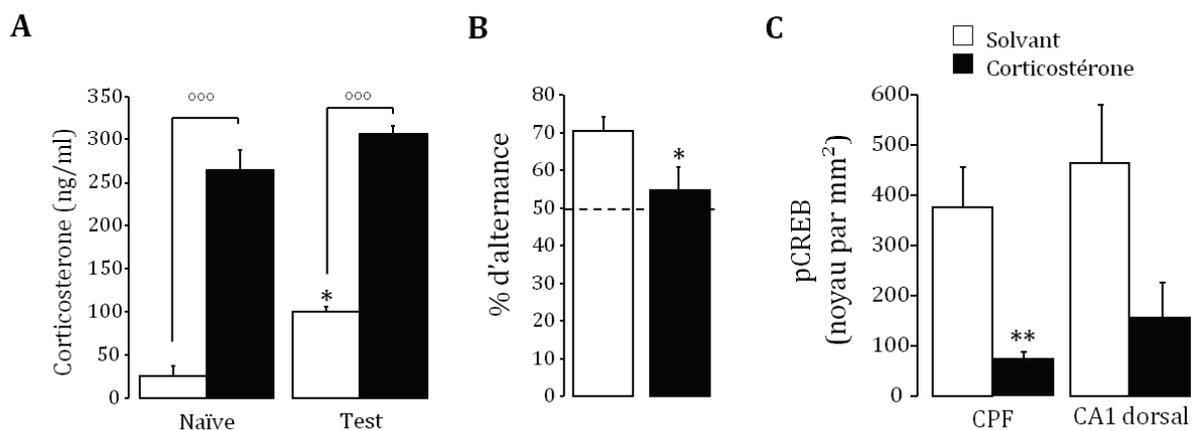


Figure 46 : effets de l'augmentation du taux de corticostérone sur la MDT et les niveaux de phosphorylation de CREB, dans le CPF et le CA1 dorsal.

(A) Les taux de corticostérone plasmatique sont augmentés après l'injection de corticostérone à 2mg/kg en conditions naïve et test. * $p < 0.05$ vs naïve-solvant, °°° $p < 0.001$ vs solvant. (B) L'injection de corticostérone provoque un déficit d'AS. * $p < 0.05$ vs solvant. (C) L'injection de corticostérone inhibe pCREB dans le CPF mais pas de façon significative dans le CA1 dorsal. ** $p < 0.01$ vs solvant.

Expérience 3. L'inhibition de la synthèse de corticostérone chez les groupes *Sevré* et *SCLI* atténue les déficits de MDT et de pCREB

Enfin, nous avons examiné si l'inhibition de la synthèse de la corticostérone est suffisante pour inverser les déficits de MDT et de pCREB induits par le sevrage ou le SCLI.

Corticostérone plasmatique (Fig. 47A)

En condition naïve, l'analyse de la variance à deux voies effectuée sur les données de corticostérone ne montre pas d'effet *groupe* significatif ($F_{(2,19)}=0.23$; NS), mais un effet *traitement* ($F_{(1,19)}=39.45$, $p<0.001$) sans interaction significative *traitement x groupe* ($F_{(1,19)}=0.16$; NS). La métyrapone induit une réduction du taux de corticostérone au sein des groupes *Contrôle*, *Sevré 1S* et *Sevré 6S* par rapport aux groupes solvant respectifs (*Contrôle* : $p=0.03$, *1S* : $p=0.001$ et *6S* : $p=0.009$).

En condition test, l'analyse de variance révèle un effet *groupe* significatif ($F_{(2,44)}=8.15$, $p=0.001$), un effet *traitement* significatif ($F_{(1,44)}=192.35$, $p<0.001$) ainsi qu'une interaction significative des effets *traitement x test* ($F_{(2,44)}=7.9$, $p=0.001$). Au regard des animaux traités avec le solvant, l'effet *groupe* est attribuable à une plus grande augmentation du taux de corticostérone induite par le test d'AS au sein du groupe *Sevré 1S* qu'au sein des groupes *Contrôle* et *Sevré 6S* ($p=0.003$ et $p=0.001$ respectivement). L'effet traitement est attribuable au fait que la métyrapone induit une réduction considérable des taux de corticostérone par rapport aux groupes solvant respectifs ($p<0.001$ pour toutes les comparaisons).

Test d'alternance spontanée

L'effet de l'injection de métyrapone sur la MDT est illustré sur la **figure 47B**. Au regard des souris solvant, les taux d'alternance sont au dessus du hasard au sein du groupe *Contrôle* ($72.72\pm 3.39\%$; $t(10)=6.71$, $p<0.001$), mais non au sein des groupes *Sevré (1S)*: $58.33\pm 5.45\%$; $t(7)=1.53$, NS ; *6S*: $54.76\pm 3.07\%$; $t(6)=1.55$, NS) et *SCLI* ($54.76\pm 4.76\%$; $t(6)=1.0$, NS). L'analyse de variance confirme une différence significative entre les groupes ($F_{(2,29)}=4.79$, $p=0.008$), les taux d'alternance étant significativement plus faible chez les souris *Sevré 1S* ($p=0.016$), *6S* ($p=0.005$) et *SCLI* ($p=0.005$) par rapport au groupe *Contrôle*. L'administration systémique de métyrapone améliore les performances pour les deux groupes *Sevré (1S)*: $81.25\pm 3.77\%$, $p=0.004$; *6S*: $70.83\pm 4.16\%$, $p=0.009$) et *SCLI* ($79.16\pm 4.16\%$, $p=0.002$) par rapport aux groupes solvant respectifs. En revanche, la métyrapone ne modifie pas les performances du groupe *Contrôle* ($71.43\pm 4.76\%$; NS vs groupe solvant). Aucun effet significatif des facteurs *groupe* ou *traitement* n'est observé sur la latence de choix (NS pour toutes les comparaisons). De plus, aucune différence significative n'est observée sur le 8^{ème} essai de la série (données non présentées), indiquant que ni le sevrage ni le traitement n'affecte la motivation à alterner.

Phosphorylation de CREB

Condition naïve : l'effet *groupe* et *traitement* a été analysé dans le CPF et la région dorsale du CA1. Les résultats n'indiquent pas différence significative quel que soit le facteur considéré dans le CPF (*traitement* et *groupe* ; NS pour les comparaisons).

En revanche, dans le **CA1 dorsal**, la métyrapone induit une diminution de pCREB ($F_{(1,25)}=11.002$, $p=0.003$) par rapport aux souris traitées avec le solvant au sein des groupes *Sevré 6S* ($p=0.03$) et *SCLI* ($p=0.02$).

Condition test : les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux souris solvant de chaque groupe respectif. L'ANOVA réalisée sur les données de pCREB (**Fig. 47C**) révèle un effet différent du traitement en fonction des groupes dans le **CPF** ($F_{(3,27)}=5.43$, $p<0.004$) mais pas dans le **CA1 dorsal** ($F_{(3,37)}=1.3$, $p=NS$). En ce qui concerne le CPF, l'analyse post-hoc confirme un effet différent du traitement entre les groupes *Sevré 1S* ($p=0.0005$), *Sevré 6S* ($p=0.02$) et *SCLI* ($p=0.008$) par rapport au groupe *Contrôle*. En effet, la métyrapone induit l'augmentation de la phosphorylation de CREB au sein des groupes *Sevré 1S* ($137.7\pm 22.3\%$), *Sevré 6S* ($73.1\pm 25.7\%$) et *SCLI* ($93.4\pm 39.9\%$) mais ne modifie pas pCREB chez les animaux *Contrôle* ($-17.7\pm 6.6\%$).

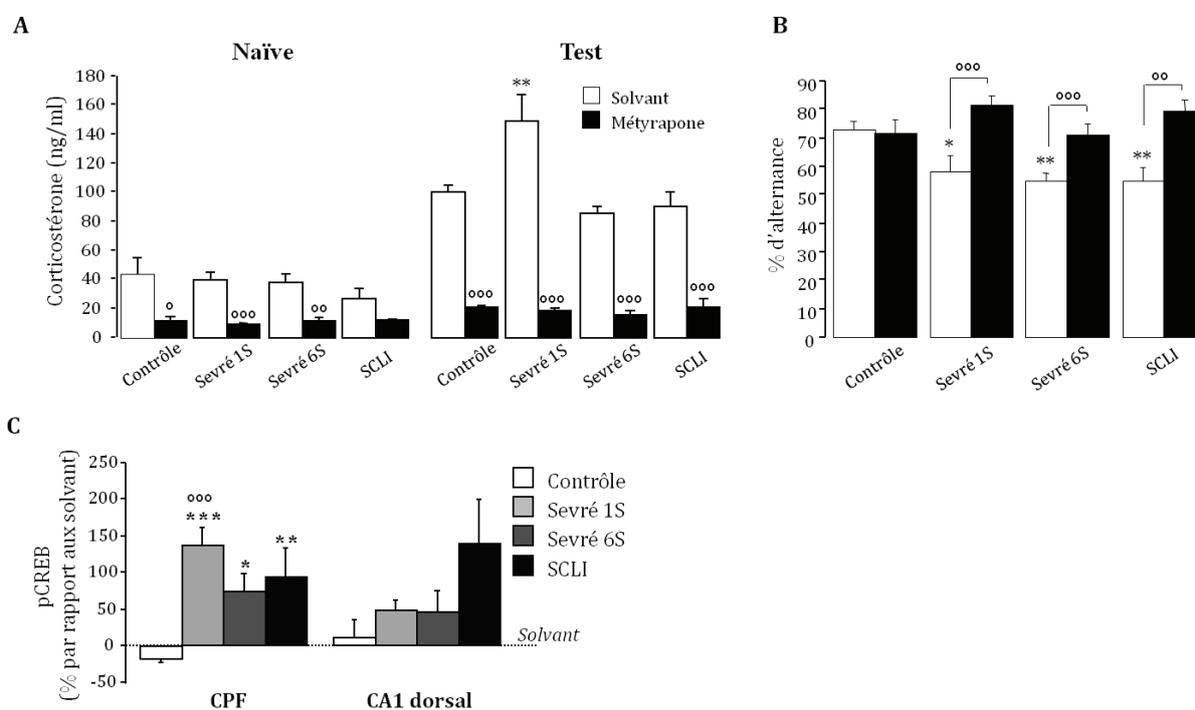


Figure 47 : effets de la métyrapone, sur la MDT et la phosphorylation de CREB.

(A) L'injection de métyrapone induit une diminution de la concentration de la corticostérone (ng/ml) en conditions basal et test. Au sein des animaux solvant, le test induit une augmentation accrue du taux de corticostérone (ng/ml) chez les animaux *Sevré 1S*. * $p<0.05$ vs *Contrôle* et *Sevré 6S* solvant, $^{\circ}p<0.05$, $^{\circ\circ}p<0.01$ vs solvant respectif. (B) La métyrapone restaure les performances des souris *Sevré 1S/6S* et *SCLI*. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs *Contrôle* solvant, $^{\circ\circ\circ}p<0.001$ vs solvant respectif. (C) Dans le CPF spécifiquement, la métyrapone augmente le niveau de pCREB au sein des souris *Sevré 1S*, *6S* et *SCLI* mais pas au sein du groupe *Contrôle*. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ et *** $p<0.001$ vs *Contrôle*, $^{\circ\circ\circ}p<0.001$ vs solvant respectif.

Conclusion : L'inhibition de la synthèse de corticostérone réduit les déficits de MDT et restaure la phosphorylation de CREB dans le CPF au sein des groupes *Sevré (IS/6S)* et *SCLI*.

Expérience 4. Le blocage des récepteurs MR dans le CPF supprime les déficits de MDT induit par le sevrage.

Pour déterminer l'implication relative des récepteurs MR et des récepteurs GR dans l'émergence des troubles de la MDT associés au sevrage, nous avons évalué l'effet des injections in situ d'antagonistes spécifiques des MR ou des GR dans le CPF ou dans le CA1 dorsal sur les performances des souris *Sevré IS*.

Au sein du **CPF (Fig. 48A)**, les analyses de variance ont mis en évidence une différence entre les groupes ($F_{(3,38)}=7.84$, $p<0,001$). Au regard des souris traitées avec le solvant, les données confirment que le sevrage ($47.4\pm 5.6\%$) induit une diminution significative des taux d'alternance par rapport au groupe *Contrôle* ($75.9\pm 6.2\%$, $p<0.05$). Les injections des deux antagonistes in situ augmentent les taux d'alternance des souris *Sevré IS* ($66.6\pm 4.3\%$ et $78.3\pm 4.3\%$ pour la mifépristone et la spironolactone respectivement, $p=NS$ et $p<0.01$ par rapport aux *Sevré IS* solvant). Cependant, seul le spironolactone induit une augmentation significative des performances.

En revanche, au sein de l'**HPC dorsal (Fig. 48B)**, les analyses ne font apparaître aucun effet *groupe* significatif ($F_{(3,36)}=2.30$, $p=NS$). Le sevrage induit une diminution significative du taux d'alternance par rapport au *Contrôle* (56.0 ± 3.3 vs $72.2\pm 3.9\%$, respectivement, $p<0.05$) mais l'injection de mifépristone ou de spironolactone ne modifie pas significativement les taux d'alternance des souris *Sevré IS* ($63.3\pm 4.1\%$ et $56.6\pm 7.1\%$ respectivement).

Les latences de choix et le pourcentage d'alternance au 8^{ème} essai (IEE de 5 sec) ne diffèrent pas significativement entre les groupes, quel que soit le facteur considéré ($p>0.5$ dans toutes les comparaisons, données non présentées).

A



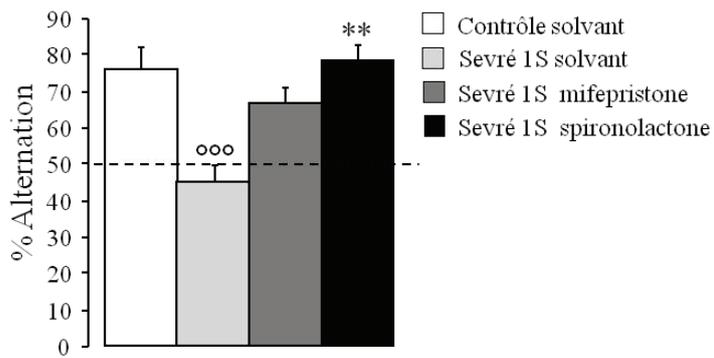
Bregma + 2.0

B



Bregma - 2.0

C



D

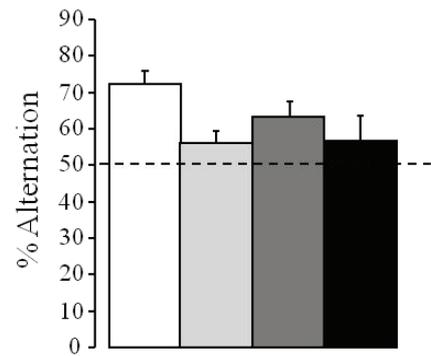


Figure 48 : effets des antagonistes MR ou GR sur les performances d'AS.

(A) L'injection dans le CPF, de spironolactone et dans une moindre mesure de mifepristone améliore les performances de souris *Sevré*. ** $p < 0.01$ vs *Sevré*/solvant. (B) Les injections d'antagonistes dans l'HPC dorsal ne modifient pas les performances des souris *Sevré 1S*.

D. Discussion

Nous avons montré dans le premier chapitre que les déficits de MDT s'accompagnent d'altérations de la phosphorylation de CREB et que la restauration de cette phosphorylation grâce à l'injection de rolipram, permettait de réduire les déficits de MDT au sein des groupes *Sevré* et *SCLI*. En parallèle, nous avons également constaté, dans le deuxième chapitre, que les groupes présentant des déficits de MDT avaient de façon constante une élévation anormalement forte de la concentration de corticostérone dans le CPF. Ainsi, nous avons mené une série d'expériences afin de déterminer s'il existait une relation causale entre les déficits de phosphorylation de CREB responsable des troubles de la MDT et les taux élevés de corticostérone.

Dans une première expérience, nous avons testé l'effet du rolipram sur les niveaux d'anxiété et de corticostérone plasmatique. Nos résultats révèlent que le rolipram exerce un effet anxiolytique au sein des groupes *Sevré 1S* et *SCLI* mais pas au sein des groupes *Contrôle*, *Alcool* et *Sevré 6S* qui ne présentent pas de comportements de type anxieux. Certaines études avaient déjà montré que le rolipram permettait de diminuer l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Shukla et al., 2008, Li et al., 2009). L'effet anxiolytique du rolipram est provoqué par son action positive sur l'activité de la voie de signalisation AMPc/PKA/CREB dont l'implication dans la régulation des comportements de type anxieux a déjà été démontrée. En effet, il a été rapporté que des faibles taux de pCREB constituent une prédisposition génétique à l'anxiété et que la diminution ou l'augmentation de la phosphorylation de CREB induisent des comportements de type anxieux ou hypo-anxieux respectivement (Pandey et al., 2005, Wand, 2005). Cependant, nos données montrent que le rolipram n'a pas d'effet sur le taux de corticostérone plasmatique dans nos conditions expérimentales. Ces premiers résultats montrent que l'augmentation de l'activité de la voie AMPc/PKA/CREB induite par le rolipram suffit à diminuer l'anxiété des souris *Sevré 1S* et *SCLI*.

Au vu de ces résultats, nous avons cherché à déterminer l'effet de la corticostérone sur l'activité de la voie AMPc/PKA/CREB. Pour cela, nous avons augmenté, au sein d'animaux *Contrôle*, la concentration de corticostérone plasmatique et examiné l'impact sur la MDT et les taux de pCREB dans le CPF et le CA1 dorsal. Il en résulte que l'augmentation importante des concentrations de corticostérone induit une diminution des performances et inhibe parallèlement la phosphorylation de CREB dans le CPF et dans une moindre mesure dans le CA1 dorsal, démontrant ainsi une relation entre les GCs et la phosphorylation de CREB. Cette expérience nous a permis d'émettre l'hypothèse ***que durant le sevrage à l'alcool, les taux anormalement élevés de corticostérone observés dans le CPF peuvent être responsables des déficits de MDT, en inhibant la phosphorylation de CREB.***

Ainsi dans une troisième expérience, nous avons examiné si l'inhibition de la synthèse de corticostérone via l'injection systémique de métyrapone peut diminuer les déficits de MDT et de

phosphorylation de CREB dans le CPF et le CA1 dorsal. Les résultats confirment que l'injection de métyrapone permet de restaurer la MDT mais également la phosphorylation de CREB dans le CPF chez les souris *Sevré* et *SCLI* et dans une moindre mesure dans le CA1 dorsal chez les *SCLI*. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que les taux anormalement élevés de corticostérone au niveau cérébral sont à l'origine des troubles de la MDT et du déficit de phosphorylation de CREB.

Ces données corroborent certaines études ayant montré un lien entre la phosphorylation de CREB et les GCs. En effet, Focking et al. (2003) mettent en évidence qu'un traitement prolongé aux GCs dans des neurones en culture cellulaire altère la phosphorylation de CREB et sa cinétique de phosphorylation, ce qui démontre des interactions entre pCREB et les GCs. Les deux types de récepteurs, MR (Grossmann et al., 2010a, Grossmann et al., 2010b) et GR (Roozendaal et al., 2002, Focking et al., 2003, Roozendaal et al., 2004, Arnsten, 2009, Barsegyan et al., 2010) sont impliqués dans cette interaction. En effet, l'équipe de Grossmann a montré que les GCs peuvent inhiber la phosphorylation de CREB via les MR, apportant ainsi une autre hypothèse de l'action des GCs sur la phosphorylation de CREB à l'origine des troubles de MDT. A l'inverse, les GCs peuvent également activer la phosphorylation de CREB, notamment en agissant en synergie avec les catécholamines (Roozendaal et al., 2002, Arnsten, 2009) et via une action ciblée sur les GR (Barsegyan et al., 2010).

Ainsi, au vu de ces éléments, nous avons cherché à déterminer l'implication relative des MR et des GR dans l'émergence des troubles de MDT induit par le sevrage à l'alcool, en injectant in situ, dans le CPF ou le CA1 dorsal, des antagonistes des MR ou des GR sur des groupes indépendants d'animaux *Sevré IS*. Les résultats ont montré que, injectée dans le CPF, la spironolactone (antagoniste des MR), mais non la mifépristone (antagoniste GR) atténue significativement, le déficit de MDT des animaux *Sevré IS*. L'implication des MR, plutôt que des GR, dans les performances des souris *Sevré* pourrait être due au fait que les tests comportementaux ont lieu seulement 15 minutes après l'injection de l'antagoniste, un laps de temps au cours duquel les récepteurs MR sont davantage recrutés que les GR (Dorey et al., 2011). Il est également possible que le sevrage entraîne une dérégulation de l'équilibre de la répartition des MR / GR durable dans le CPF mais pas dans l'HPC, ce qui peut également expliquer l'absence d'effet des antagonistes lorsqu'ils sont injectés dans l'HPC dorsal. En effet, il a déjà été démontré que la CCA diminue de façon significative les taux de protéine GR dans les régions corticales et l'HPC mais que le sevrage normalise les niveaux des récepteurs GR uniquement dans l'HPC (Roy et al., 2002).

En conclusion, notre étude est la première à mettre en évidence un lien de causalité entre l'augmentation des taux de corticostérone dans le CPF et les déficits de MDT induits par des modifications de pCREB dans le CPF chez les animaux *Sevré*.

Ces résultats peuvent avoir des implications importantes dans l'amélioration des soins médicaux pendant la période aigue du sevrage à l'alcool, à l'aide d'antagonistes des récepteurs MR.

Chapitre IV :

Efficacité du diazépam pour prévenir les perturbations du cortex préfrontal induites par le sevrage à l'alcool

A. Introduction

Dans un dernier chapitre, nous avons réalisé une étude portant sur l'efficacité du diazépam, à réduire les altérations moléculaires, neuroendocriniennes et cognitives induites par le sevrage à l'alcool, qui ont été mises en évidence dans les chapitres précédents. Actuellement, les benzodiazépines sont les plus utilisées chez l'homme et constituent la pierre angulaire du traitement du syndrome de sevrage à l'alcool. Les propriétés des benzodiazépines permettent de prévenir et de traiter les symptômes physiques et l'anxiété provoqués par le sevrage, en diminuant l'hyperactivité du système nerveux autonome. En effet, durant un sevrage à l'alcool, les récepteurs aux GABA sont désensibilisés et leurs nombres sont diminués. Ces événements conduisent à un moindre effet inhibiteur du système gabaérgique, en partie responsable de l'hyperactivité de l'axe corticotrope en début de sevrage. Les benzodiazépines sont utilisées pour réduire l'hyperexcitabilité du système nerveux en agissant comme agonistes du GABA-A et en favorisant l'ouverture du canal chlore post-synaptique. Ainsi, pour la même quantité de GABA, la fréquence d'ouverture du canal ionique sera plus importante entraînant une augmentation de l'inhibition. Il existe plusieurs types de benzodiazépines dont la spécificité d'action dépend de la sous unité à laquelle elle se lie ; elles peuvent avoir des effets hypnotique/sédatif, anxiolytique, myorelaxant ou anticonvulsivant. Le diazépam est notamment utilisé lors du syndrome de sevrage alcoolique pour ses propriétés anxiolytiques. Il permet de substituer l'action de l'alcool pendant le sevrage et de prévenir les complications du sevrage à l'alcool en reproduisant l'action de l'alcool sur le système GABAérgique.

De plus, des études neuroanatomiques et pharmacologiques ont mis en lumière l'importance du système GABAérgique dans la régulation de la réponse neuroendocrinienne au stress. En effet, de nombreuses données ont clairement démontré que l'activité de l'axe corticotrope est régulée par des voies GABAérgiques (Calogero et al., 1988a, Arvat et al., 2002, Cullinan et al., 2008). Le GABA, est un neurotransmetteur inhibiteur bien connu pour diminuer la libération de l'ACTH (Makara and Stark, 1974), probablement par une action centrale sur hypothalamus au niveau du PVN, via les neurones CRH (Cullinan et al., 2008). Il a notamment été montré que l'injection de diazépam, 30 minutes avant un stress, inhibe l'augmentation de corticostérone normalement observée dans l'HPC de souris. Cette expérience constitue une preuve in vivo directe de l'interaction dynamique entre les benzodiazépines et le taux de corticostérone dans l'HPC dans un état de stress (Beracochea et al., 2011).

Cependant à ce jour, à notre connaissance, aucune étude n'a cherché à déterminer *l'efficacité du traitement au diazépam, à court et long terme, à prévenir l'émergence d'altérations de la phosphorylation de CREB et des perturbations de l'axe corticotrope au niveau du CPF durant un sevrage à l'alcool*. Pour cela, nous avons traité de façon chronique des souris *Sevré* avec du diazépam

durant la phase aigue du sevrage, puis l'effet du traitement à court terme a été étudié sur l'anxiété, la MDT, la réactivité de l'axe corticotrope ainsi que sur la phosphorylation de CREB après le test d'AS. L'efficacité du traitement à long terme a également été étudiée à l'aide des mêmes analyses effectuées 6 semaines après le sevrage soit 5 semaines après la fin du traitement au diazépam.

B. Méthodologie

Expérience 1. Effets d'un traitement chronique au diazépam sur l'anxiété

Des souris *Contrôle* et *Sevré* ont été traitées avec du diazépam durant 9 jours puis ont été soumises au test du labyrinthe en croix surélevé, 24h après la dernière injection de diazépam (correspondant à 1 semaine après le sevrage). Comme décrit dans la **figure 49**, deux doses ont été testées : **1mg/kg** pendant 6 jours puis **0.5mg/kg** sur les 2 jours et **0.125mg/kg** le neuvième jour. Sur un groupe indépendant, les souris sont traitées selon la même procédure mais avec une dose deux fois plus faible. Les souris traitées avec le diazépam sont comparées à des souris *Contrôle* et *Sevré* traitées avec du solvant pendant 9 jours.

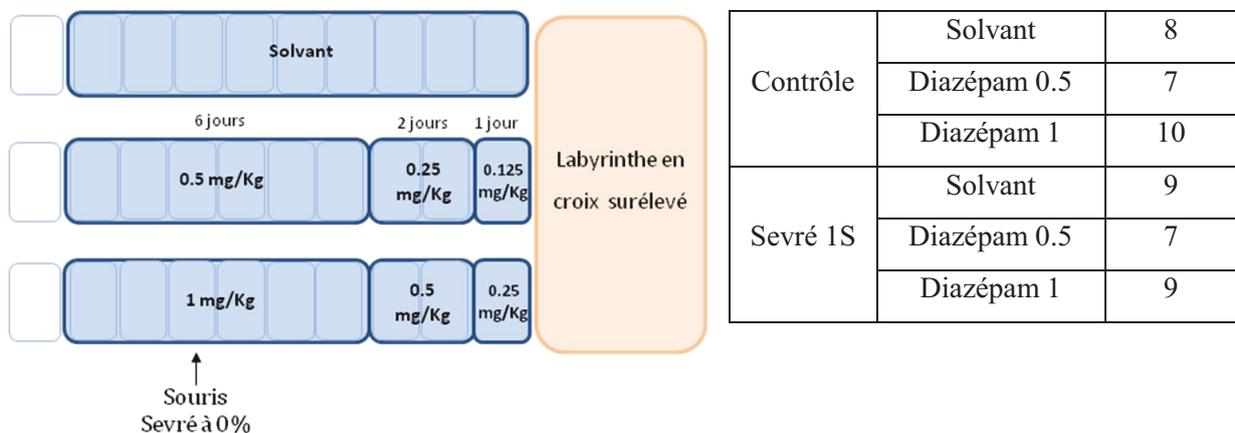


Figure 49 : protocole du traitement au diazépam et effectifs des groupes expérimentaux.

Expérience 2. Effets du diazépam sur la MDT et pCREB.

Les effets du diazépam ont été testés sur la MDT et sur la phosphorylation de CREB. Dans ce but, des animaux *Contrôle* et *Sevré* ont été traités au Diazépam (**Fig. 50**) durant 9 jours (6 jours avec une dose de 1mg/kg, 2 jours à 0.5mg/kg puis 1 jour à 0.25mg/kg) avant de réaliser le test de MDT. La session test est effectuée soit 24 heures après la dernière injection (correspondant à 1 semaine après le sevrage, groupe *Contrôle 1S* ou *Sevré 1S*) soit 5 semaines après la dernière injection (correspondant à 6 semaines de sevrage, groupe *Contrôle 6S* ou *Sevré 6S*). Les animaux ont ensuite été sacrifiés afin de recueillir le sang et récupérer les cerveaux. Des souris ont également été sacrifiées en condition naïve après avoir reçu des traitements similaires.

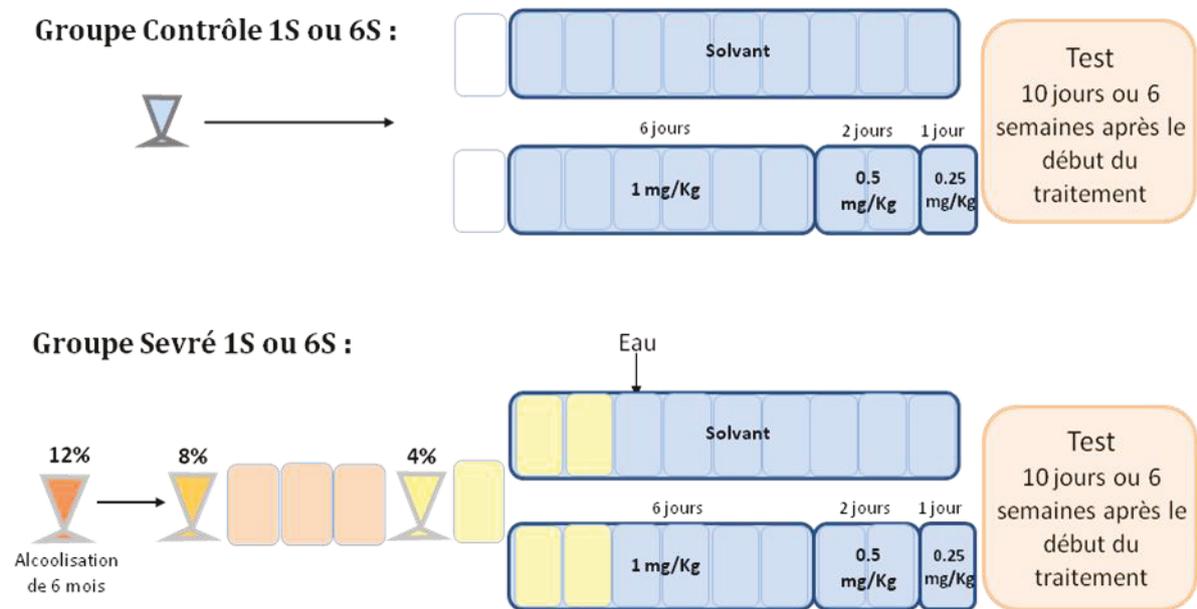


Figure 50 : détail du sevrage et du traitement au diazépam

		Naïve	Test
Contrôle 1S	Solvant	3	7
	Diazépam	3	7
Sevré 1S	Solvant	3	6
	Diazépam	3	8
Contrôle 6S	Solvant	3	6
	Diazépam	4	7
Sevré 6S	Solvant	4	6
	Diazépam	4	7

Tableau 4 : effectif des groupes expérimentaux en conditions naïve ou test

Expérience 3. Effets du diazépam sur les taux intra-CPF de corticostérone

Une cohorte indépendante d’animaux a été opérée afin d’implanter un guide sonde dans le CPF, 15 jours avant le test de MDT pour déterminer l’effet du traitement au diazépam sur la concentration de corticostérone. Pour cela, les animaux ont reçu le traitement chronique au diazépam ou la solution solvant avant d’être microdialysés soit 24heures après la dernière injection (correspondant à 1 semaine après le sevrage, *Contrôle 1S* et *Sevré 1S*, n=7 par groupe) soit 5 semaines après la dernière injection (correspondant à 6 semaines de sevrage, *Contrôle 6S* et *Sevré 6S*, n=7 par groupe).

C. Résultats

Expérience 1. Le traitement chronique au diazépam induit une diminution de l'anxiété

La **figure 51** représente les résultats des souris soumises au test du labyrinthe en croix surélevé afin de déterminer l'effet du diazépam sur l'anxiété. Les analyses portent sur l'index de temps et de distance parcourue dans les bras ouverts. On observe un effet *traitement* chez les souris *Sevré IS* (Temps : $F_{(2,22)}=8.21$; $p<0.002$; Distance : $F_{(2,22)}=6.76$; $p<0.005$) mais non chez les souris *Contrôle IS* (Temps : $F_{(2,22)}=0.95$; NS ; Distance : $F_{(2,22)}=0.84$; NS). Plus précisément, les souris *Sevré IS* traitées avec la dose de 1mg/kg visitent significativement plus les bras ouverts que les souris *Sevré IS* traitées avec le solvant ou avec la dose de 0.5mg/kg (Temps : $p\leq 0.005$; Distance : $p\leq 0.007$). En revanche, l'ANOVA ne montre pas de différence sur la distance totale parcourue (NS).

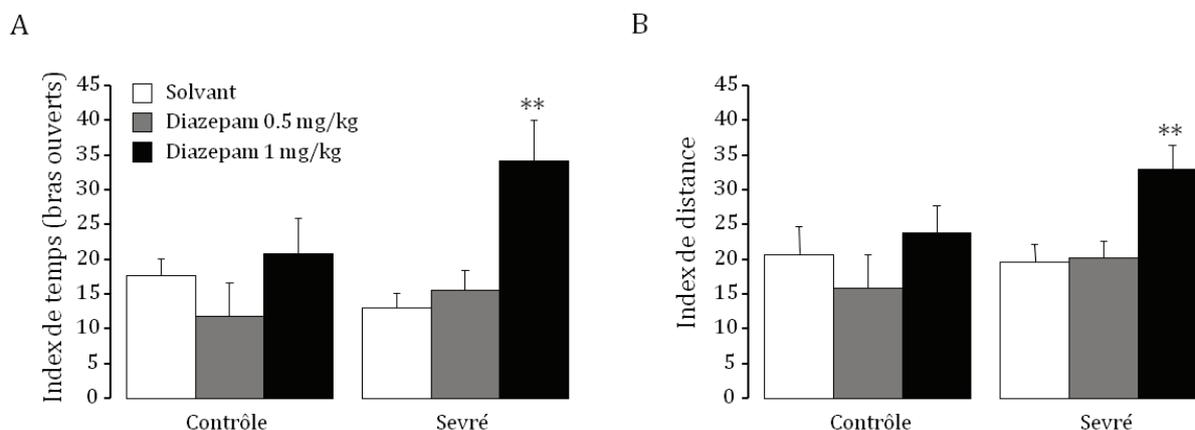


Figure 51 : effets d'un traitement chronique au diazépam sur « l'anxiété ».

La dose de 1mg/kg induit une augmentation du temps passé (A) et de la distance (B) parcourue dans les bras ouverts chez les animaux *Sevré IS*. ** $p<0.01$ vs *Sevré IS* solvant et Diazépam 0.5mg/kg.

Conclusion : Ces données révèlent un effet anxiolytique de l'administration chronique du diazépam chez les souris *Sevré IS* pour la dose de 1mg/kg.

Expérience 2. Le diazépam améliore transitoirement les performances de MDT et pCREB dans le CPF chez le groupe Sevré 1S

Test d'alternance spontanée

L'effet du traitement au diazépam sur la MDT et pCREB n'a été testé que pour la dose efficace (1mg/kg) de l'expérience précédente. Les résultats sont illustrés sur la **figure 52**. L'analyse de variance confirme un effet significatif de l'interaction des facteurs *groupe* x *traitement* ($F_{(3,45)}=3.90$, $p=0.01$). En effet, au regard des souris traitées avec le solvant, les taux d'alternance sont au dessus du hasard au sein des deux groupes *Contrôle* (*Contrôle 1S* : $69.05\pm 2.38\%$; $t(6)=8.0$, $p<0.001$; *Contrôle 6S* : $72.22\pm 3.51\%$; $t(5)=6.32$, $p=0.001$), mais non au sein des deux groupes *Sevré* (*Sevré 1S* : $50.00\pm 4.30\%$; $t(5)=0$, NS ; *Sevré 6S* : $55.55\pm 5.55\%$; $t(5)=1.0$, NS). En revanche, le Diazépam améliore les performances des souris *Sevré 1S* ($77.08\pm 3.05\%$; $p<0.001$ vs *Sevré 1S/solvant*) et dans une moindre mesure, mais de façon non significative, des souris *Sevré 6S* ($75.00\pm 7.1\%$; $p=0.06$ vs *Sevré 6S/solvant*). Au sein des deux groupes *Contrôle*, le Diazépam ne modifie pas les taux d'alternance (*Contrôle 1S* : $64.28\pm 4.34\%$; NS ; *Contrôle 6S* : $76.19\pm 8.80\%$; NS vs solvant respectif).

Cependant, aucun effet *groupe* ou *traitement* n'est observé sur la latence de choix ($p=NS$ pour toutes les comparaisons) ou sur le pourcentage d'alternance au 8^{ème} essai de la session de test, indiquant que ni le sevrage ni le traitement n'affecte la motivation à alterner.

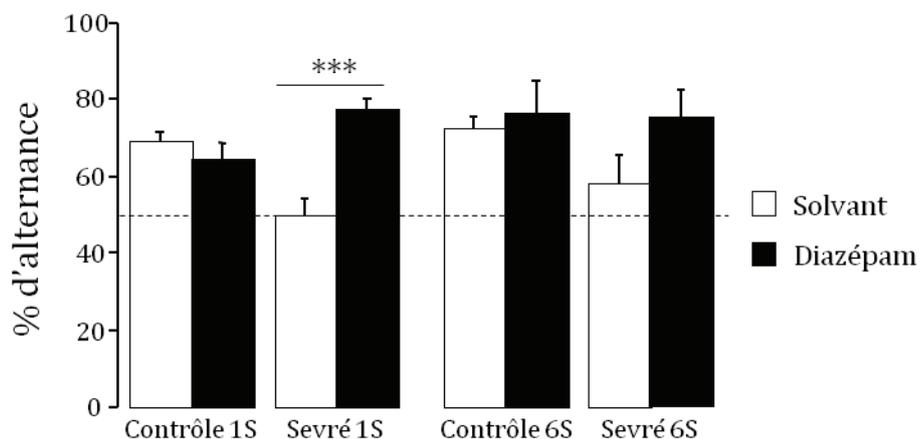


Figure 52 : effets du traitement au diazépam sur l'AS.

Le diazépam améliore les performances des souris *Sevré 1S*. *** $p<0.001$ vs solvant respectives.

Corticostéroïde plasmatique

L'analyse ANOVA ne montre pas d'effet *groupe* ($F_{(3,19)}=2.78$, NS) ou *traitement* ($F_{(1,19)}=0.63$, NS) en condition naïve (**Fig. 53A**) sur la concentration de corticostéroïde (ng/ml) plasmatique. En

effet, le diazépam ne modifie pas significativement les taux de corticostérone (*Contrôle 1S*: 23.55±10.3, *Sevré 1S*: 21.2±6.5, *Contrôle 6S*: 18.7±1.9 et *Sevré 6S*: 26.2±9.5) par rapport aux groupes respectifs traités avec le solvant (*Contrôle 1S*: 6.32±2.3, *Sevré 1S*: 18.2±8.8, *Contrôle 6S*: 11.9±3.2 et *Sevré 6S*: 36.9±8.2). De même, en condition test (**Fig. 53B**), les facteurs *groupe* ($F_{(3,45)}=0.46$, NS) et *traitement* ($F_{(1,45)}=1.09$, NS) n'ont pas d'effet. Le traitement au diazépam n'altère pas l'augmentation de corticostérone induite par le test d'AS (*Contrôle 1S*: 123.9±22.9, *Sevré 1S*: 124.0±7.4, *Contrôle 6S*: 130.6±15.5 et *Sevré 6S*: 124.5±9.6) par rapport aux souris solvant respectives (*Contrôle 1S*: 128.3±20.4, *Sevré 1S*: 162.3±24.7, *Contrôle 6S*: 119.9±13.2 et *Sevré 6S*: 145.1±21.6).

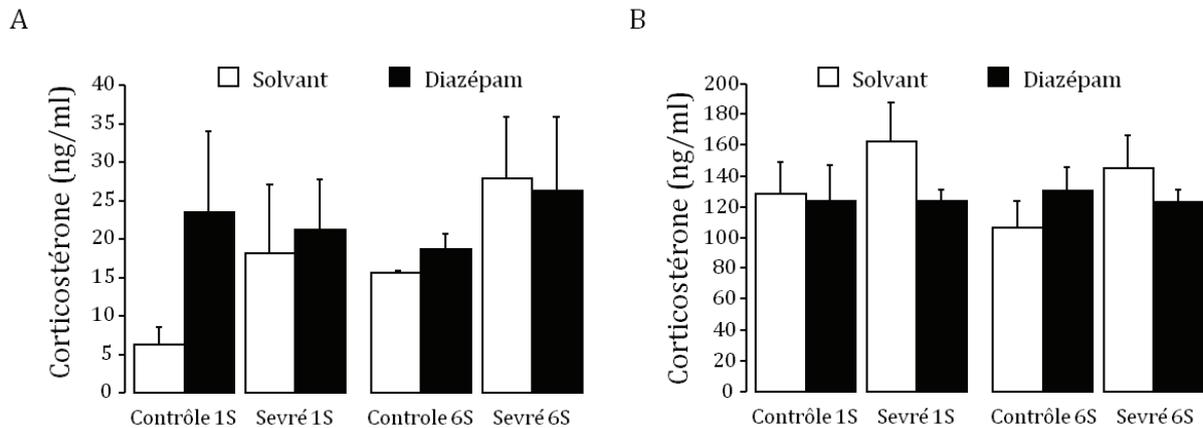


Figure 53 : effets du sevrage et du diazépam en conditions naïve (A) et test (B) sur la corticostérone plasmatique.

Immunohistochimie

Condition naïve : les effets *groupe* et *traitement* ont été analysés en condition naïve dans le CPF (**Fig. 54A**) et le CA1 dorsal (**Fig. 54B**). Les résultats n'indiquent pas de différence significative quel que soit le facteur et la structure considérés (*traitement* et *groupe* ; NS dans toutes les comparaisons).

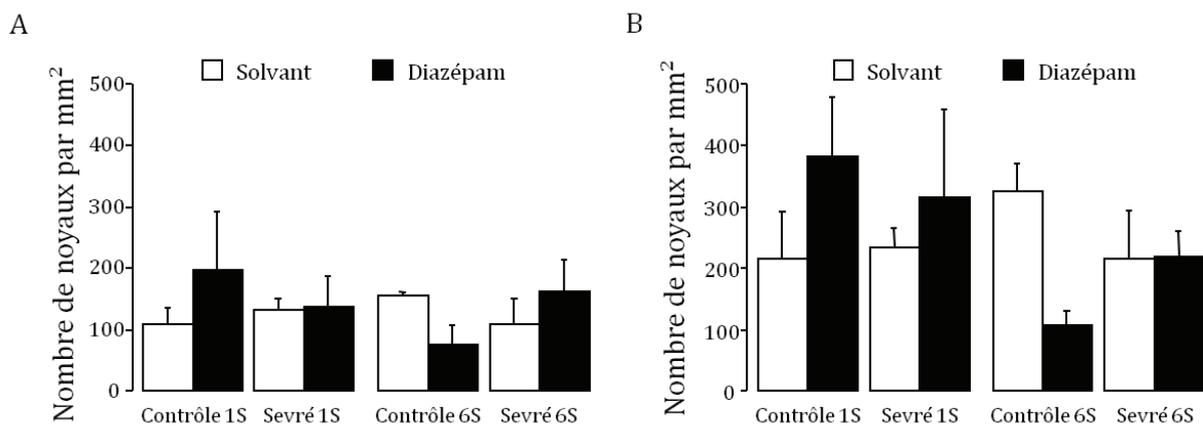


Figure 54 : effets du diazépam et du sevrage sur pCREB dans le CPF (A) et le CA1 dorsal (B) en condition naïve.

Condition test : les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux groupes solvant respectifs (**Fig. 55**).

Dans le **CPF (Fig. 55A)**, l'analyse ANOVA montre que le traitement au diazépam induit un effet différent selon le groupe ($F_{(3,24)}=3.74$, $p=0.02$). En effet, l'analyse post-hoc confirme que le diazépam ne modifie pas le niveau de pCREB par rapport aux souris solvant des groupes respectifs, chez les animaux *Contrôle 1S* ($40.0\pm 21.32\%$; NS), *Sevré 6S* ($58.38\pm 36.36\%$; NS) et *Contrôle 6S* ($-20.9\pm 42.4\%$; NS) mais induit une augmentation significative de la phosphorylation de CREB au sein du groupe *Sevré 1S* ($78.9\pm 16.9\%$; $p=0.003$ vs solvant respectif). Cette observation est renforcée par les différences significatives entre les groupes *Sevré 1S/6S* et le groupe *Contrôle* ($p<0.01$ pour les deux comparaisons).

Dans le **CA1 dorsal (Fig. 55B)**, contrairement aux données du CPF, l'ANOVA ne montre pas de différence significative entre les groupes ($F_{(3,24)}=1.58$, $p=NS$). En effet, quel que soit le groupe, le traitement au diazépam ne modifie pas significativement la phosphorylation de CREB par rapport aux souris solvant du groupe respectif (*Contrôle 1S*: $49.2\pm 28.8\%$; *Sevré 1S* : $61.75\pm 25.14\%$; *Contrôle 6S*: $-11.3\pm 25.1\%$ et *Sevré 6S*: 62.1 ± 36.1 , $p>0.05$ pour toutes les comparaisons).

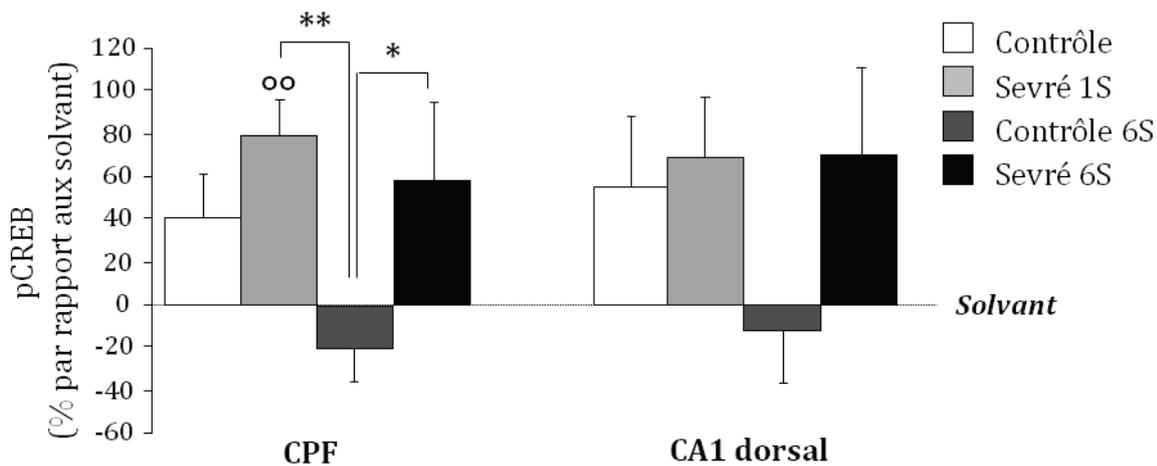


Figure 55 : effets du diazépam sur la phosphorylation de CREB.

Le traitement au diazépam induit l'augmentation de pCREB au sein du groupe *Sevré 1S* par rapport aux souris solvant respectives au sein du CPF. En revanche, aucune différence n'est observée au sein du CA1 dorsal. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs *Contrôle 6S*. °° $p<0.01$ vs solvant respectif. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation par rapport aux souris solvant respectives.

L'analyse des corrélations (**Fig. 56**) montre que les performances comportementales corrént positivement avec le niveau d'activation de pCREB (nombre de noyau par mm^2) dans le CPF au sein des groupes *Sevré 1S* et *6S* (*1S* : $R=-0.31$; $p=0.04$; *6S* : $R=-0.49$, $p=0.01$). En revanche, dans le groupe *Sevré 6S* et à l'inverse du groupe *Sevré 1S*, les performances corrént également positivement

avec le taux d'activation de pCREB dans le CA1 dorsal ($R=-0.6$; $p=0.003$). L'ensemble de ces corrélations montre que les souris *Sevré* ayant les meilleures performances sont celles traitées avec le diazépam et présentant les niveaux de pCREB les plus élevés. Ces données confirment un effet bénéfique du traitement chronique au diazépam sur l'activité cérébrale et la MDT. En outre, aucune corrélation significative entre les performances de MDT et pCREB n'est retrouvée au sein des groupes *Contrôle*.

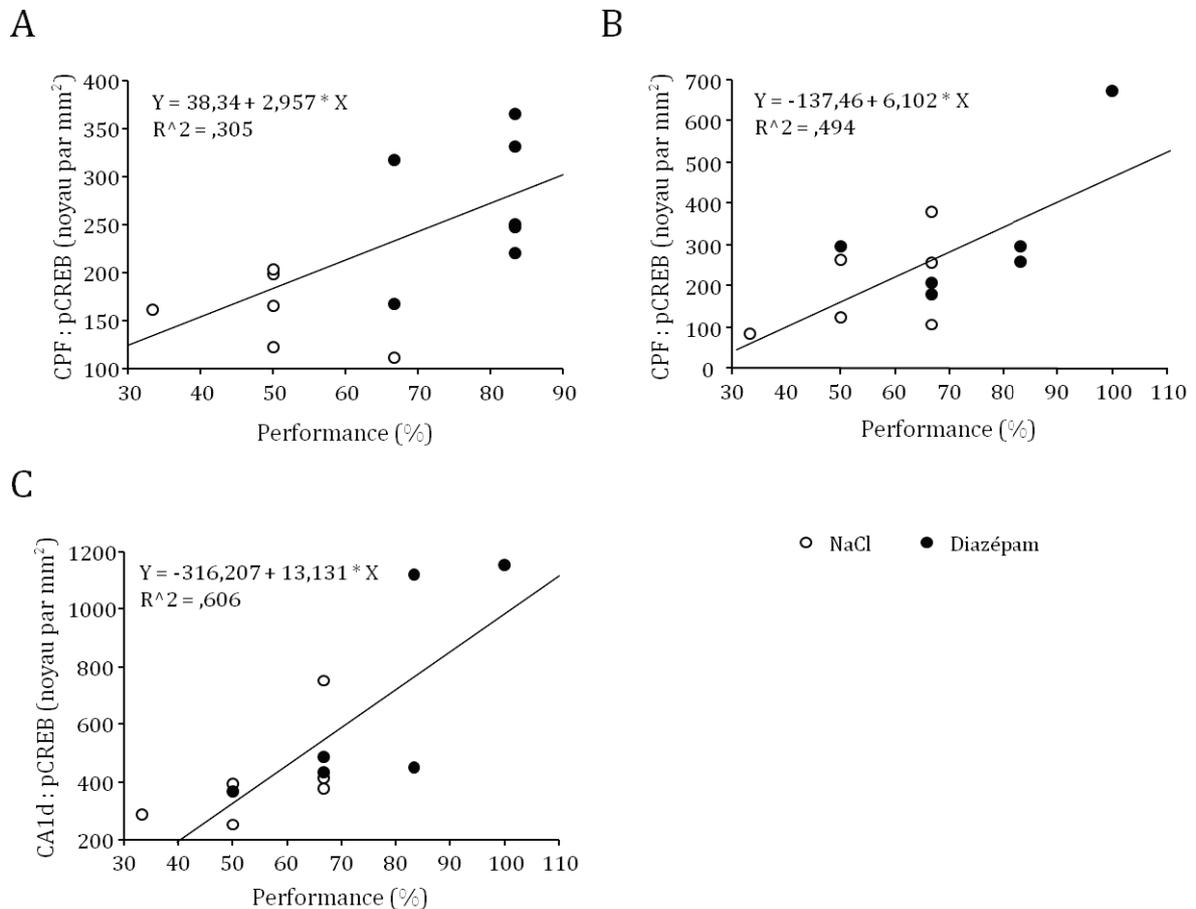


Figure 56 : corrélations entre les performances de MDT et pCREB.

Corrélations positives entre les performances de MDT et les niveaux de pCREB (nombre de noyau par mm²) dans le CPF au sein des souris *Sevré 1S* (A) et des *Sevré 6S* (B). Au sein des souris *Sevré 6S* uniquement, il existe également une corrélation positive entre l'activité de pCREB et les performances de MDT, au sein du CA1 dorsal.

Expérience 3. Le diazépam réduit l'augmentation excessive du taux de corticostérone dans le CPF induite par le sevrage

Test d'alternance spontanée

Les effets du traitement chronique au diazépam sur les performances comportementales sont illustrés sur la **figure 57**. Au regard des souris solvant, les taux d'alternance sont au dessus du hasard, au sein des deux groupes *Contrôle* (*1S*: $69.05 \pm 4.34\%$; $t(6)=4.38$, $p<0.004$; *6S*: $76.2 \pm 6.15\%$; $t(10)=6.48$, $p<0.001$), mais pas au sein des deux groupes *Sevré 1S* et *6S* (*1S*: $52.38 \pm 5.67\%$; $t(6)=0.42$, $p=NS$; *6S*: $52.38 \pm 5.67\%$; $t(6)=0.42$, $p=NS$). L'analyse de la variance confirme une différence significative entre les groupes ($F_{(2,24)}=4.79$, $p=0.002$), les taux d'alternance étant significativement plus élevés chez les souris *Contrôle 6S* ($p \leq 0.005$ vs *Sevré 1S* et *6S*).

Le traitement chronique au diazépam améliore les performances pour les deux groupes *Sevré* (*1S*: $76.19 \pm 6.15\%$; $t(6)=4.26$, $p<0.005$; *6S*: $71.4 \pm 5.66\%$; $t(6)=6.97$, $p<0.001$) par rapport aux groupes solvant respectifs ($p<0.05$ pour toutes les comparaisons). En revanche, le diazépam ne modifie pas les performances des deux groupes *Contrôle* (*1S*: $85.71 \pm 6.73\%$; NS; *6S*: $83.33 \pm 5.14\%$; NS vs groupes solvant respectifs).

Aucun effet *groupe* ou *traitement* n'est observé sur la latence de choix (NS pour toutes les comparaisons), ni sur le 8^{ème} essai de la session test, indiquant que ni le sevrage ni le traitement n'affecte la motivation à alterner.

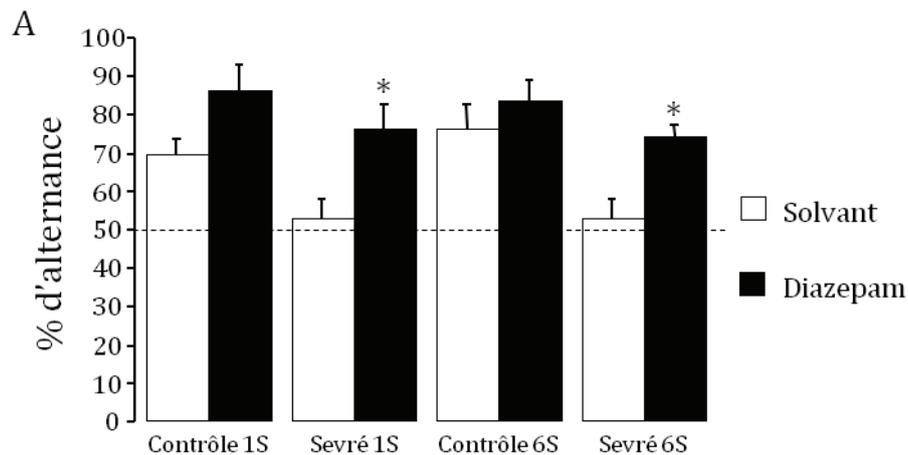


Figure 57 : effets du traitement au diazépam sur l'AS.

Le diazépam améliore les performances des souris *Contrôle 1S*, *Sevré 1S* et *6S*. * $p<0.05$ et ** $p<0.01$ vs solvant respectives.

Corticostérone intracérébrale.

L'analyse des concentrations absolues des taux de base de corticostérone (moyenne à partir de quatre points mesurés avant le test d'alternance, en ng/ml) indique un effet *groupe* (**Fig. 58B**)

($F_{(3,48)}=4.99$; $p=0.004$) sans effet significatif du *traitement* ($F_{(1,48)}=3.04$; NS) ni de l'interaction des facteurs ($F_{(3,48)}=0.27$; NS). Plus précisément, au sein des groupes traités avec le diazépam, le groupe *Sevré 1S* a un taux de corticostérone plus élevé que les *Sevré 6S*. ($p=0.005$).

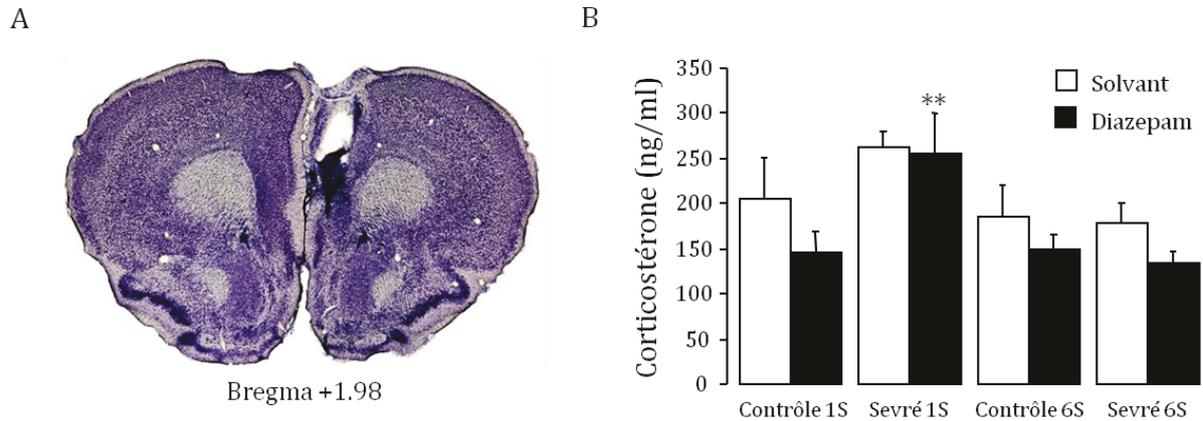


Figure 58 : effets du diazépam à court et long terme, sur les concentrations en corticostérone (ng/ml) au sein des groupes *Contrôle* et *Sevré*.

(A) Illustration du site d'implantation de la sonde de dialyse dans le CPF. (B) Le taux de corticostérone intra-CPF est plus élevé chez les souris *Sevré 1S* que chez les *Sevré 6S*, au regard des souris traitées au diazépam. ** $p<0.01$ vs *Sevré 6S/diazépam*.

L'analyse ANOVA, en mesures répétées, réalisée sur l'évolution de la corticostérone au cours du temps témoigne d'une interaction significative des facteurs *groupe* et *traitement* ($F_{(3,528)}=2.64$; $p=0.05$)

Au regard des animaux traités avec le **solvant** (Fig. 59A), l'ANOVA confirme une évolution différente des taux de corticostérone en fonction des groupes ($F_{(33,264)}=1.55$; $p=0.03$). En effet, le test induit une augmentation significative et progressive de la concentration de corticostérone de 15 à 60 minutes par rapport à la moyenne basale ($p\leq 0.05$) au sein du groupe *Contrôle 1S* et des groupes *Sevré 1S* et *6S*, et de 30 à 60 minutes au sein du groupe *Contrôle 6S* ($p\leq 0.05$). Cependant, l'augmentation du taux de corticostérone induite par le test est plus importante au sein des groupes *Sevré 1S* (au point 45 minutes, $p=0.01$ vs *Contrôle 1S*) et *Sevré 6S* (au point 30 minutes, $p=0.03$ vs *Contrôle 1S* et $p=0.01$ vs *Contrôle 6S*).

Au sein des groupes traités avec le **diazépam** (Fig. 59B), les analyses ne témoignent pas d'une différence significative de l'évolution des taux de corticostérone en fonction des groupes ($F_{(33,264)}=1.18$; $p=NS$) montrant que le diazépam diminue l'effet du sevrage.

Cependant, l'analyse de l'effet *traitement* au sein de chaque groupe indique un effet significatif seulement au sein du groupe *Sevré 1S* ($F_{(1,132)}=7.40$; $p=0.018$) mais non chez les groupes *Contrôle 1S* ($F_{(1,132)}=0.17$; NS), *Contrôle 6S* ($F_{(1,132)}=1.12$; NS) et *Sevré 6S* ($F_{(1,110)}=1.30$; NS). Plus précisément, le diazépam diminue le taux de corticostérone à 30 minutes ($F_{(1,12)}=4.82$; $p=0.04$) et à 45 minutes ($F_{(1,12)}=7.3$; $p=0.019$) au sein du groupe *Sevré 1S*, par rapport au souris solvant respectives.

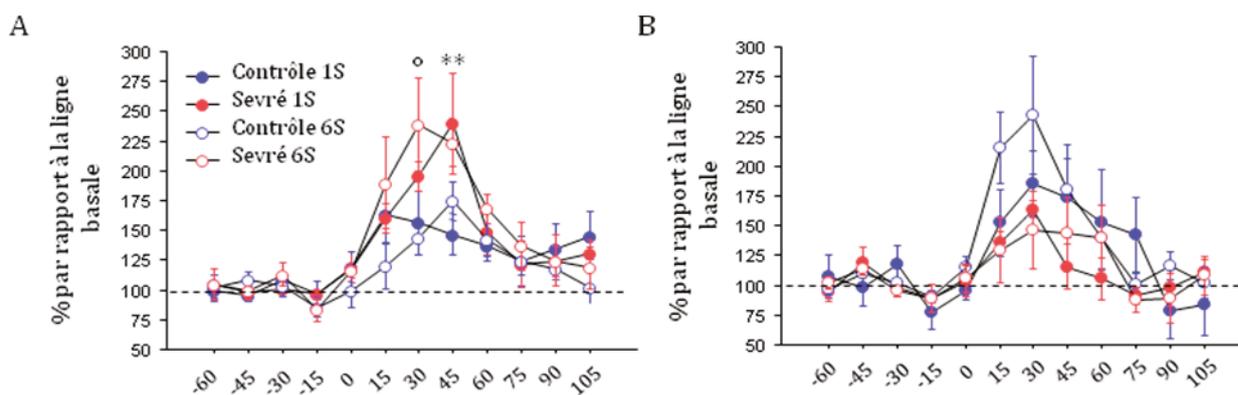


Figure 59 : effets du sevrage et du traitement chronique au diazépam sur la concentration de corticostérone dans le CPF.

(A) Chez les animaux solvant, l'augmentation du taux de corticostérone induite par le test est plus élevée chez les souris *Sevré 1S* et *6S*. $^{\circ}p < 0.05$ vs *Contrôle 1S* et *6S*, $^{**}p < 0.01$ vs *Contrôle 6S*. (B) Le traitement au diazépam atténue la suractivation de l'axe corticotrope, au sein des animaux *Sevré 1S* et *6S*.

D. Discussion

Dans ce dernier chapitre, nous avons cherché à tester l'effet du traitement de première intention du sevrage à l'alcool, les benzodiazépines, sur les troubles cognitifs, moléculaires et neuroendocriniens mis en évidence chez les souris sevrées. Pour cela, nous avons traité les souris sevrées avec du diazépam (Valium®) utilisé, chez l'homme, dans le traitement du sevrage à l'alcool et dans le traitement de l'anxiété (Rondepierre et al., 1964, Wasilewski et al., 1996, Lonergan et al., 2009, Cagni et al., 2012, Muzyk et al., 2013).

Les résultats confirment dans une première expérience que le traitement au diazépam avec la dose de 1mg/kg diminue l'anxiété des animaux *Sevré IS*. En revanche, et contrairement aux résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3, au sein des animaux traités avec le solvant, aucune différence n'est observée entre les *Contrôle IS* et les *Sevré IS*. L'absence d'effet du sevrage sur l'anxiété peut être attribuée à l'effet stressant du protocole d'injection du diazépam par voie ip pendant 9 jours consécutifs. En effet, les injections répétées pourraient induire un stress journalier et réduire les différences entre les groupes *Contrôle IS* et *Sevré IS*. Cependant, les données vont dans le sens d'un effet anxiolytique du traitement pour la dose de 1mg/kg seulement chez le groupe *Sevré IS*.

Le traitement chronique au diazépam permet également de réduire les troubles de MDT dans le test d'AS. Une nette amélioration des performances est observée au sein du groupe *Sevré IS* et dans une moindre mesure au sein du groupe *Sevré 6S*. Des données cliniques ont déjà montré que le lorazépam et plus particulièrement le diazépam, deux médicaments de la famille des benzodiazépines, permettaient de diminuer le syndrome de sevrage et d'améliorer les fonctions cognitives à partir du 8ème jour de sevrage (Ritson and Chick, 1986). De même, des effets bénéfiques du traitement au diazépam ont été observés sur les comportements sociaux et les troubles locomoteurs, dans un modèle murins de sevrage à l'alcool (Knapp et al., 2005).

L'effet du diazépam sur la mémoire a été largement étudié. La majorité des données s'accorde pour attribuer un effet délétère du diazépam sur les fonctions mnésiques. Ainsi, il est reconnu que les benzodiazépines induisent une amnésie antérograde (Curran, 1991, Barbee, 1993, Jaffe, 1990, Woods et al., 1992) et que leurs effets sur les processus cognitifs semblent être spécifiques de la phase de consolidation (Barbee, 1993, Izquierdo and Medina, 1993). En revanche, l'effet du diazépam sur la MDT n'est pas clair et la littérature rapporte des données contradictoires. En effet, l'absence (Curran, 1991, Rusted et al., 1991) d'effet du diazépam tout comme un effet délétère (White et al., 1997) sur la MDT, ont été rapportés. L'effet néfaste du diazépam sur la MDT pourrait notamment être provoqué par des troubles de l'attention et de la vigilance (Preston et al., 1989, Rich and Brown, 1992). Cependant, malgré la diversité des données, il apparaît que dans le cas spécifique d'un sevrage à l'alcool, le diazépam pourrait avoir un effet favorable sur la MDT.

Le traitement au diazépam permet également de restaurer, 24 heures après l'arrêt du traitement, la phosphorylation de CREB induite par le test d'AS dans le CPF mais pas dans le CA1 dorsal. Cependant, l'amélioration de la phosphorylation de CREB est transitoire puisque 5 semaines après la fin du traitement, le diazépam n'a plus d'effet significatif sur pCREB. En revanche, l'analyse approfondie des données du groupe *Sevré 6S* montre une corrélation positive entre le niveau de pCREB dans le CPF ou le CA1 dorsal et les performances de MDT. Ces résultats indiquent également que les souris avec les niveaux de pCREB les plus élevés et les meilleures performances sont les souris traitées avec le diazépam, confirmant un effet positif prolongé du diazépam sur l'activité cérébrale. En outre, lorsque le traitement est réalisé 5 semaines avant les tests comportementaux, les données de pCREB et d'AS sont plus hétérogènes. Ces données démontrent soit que l'effet du traitement au diazépam s'estompe au cours du temps soit une hétérogénéité dans la réponse aux traitements. En clinique, l'hétérogénéité de l'effet du traitement au diazépam chez les abstinentes est une donnée courante (Hack et al., 2006, Bharadwaj et al., 2012).

En parallèle, l'étude de l'effet du diazépam sur l'activité de l'axe corticotrope n'a pas montré d'effet significatif sur le taux plasmatique de corticostérone, quel que soit la condition (basale ou test) et le groupe. En outre, compte tenu de l'effet anxiolytique du diazépam sur les animaux *Sevré 1S*, l'absence de variation du taux de corticostérone montre que les GCs ne sont pas les seuls marqueurs biologiques du stress pouvant expliquer les modifications comportementales observées durant un sevrage aigu. L'effet anxiolytique du diazépam pourrait alors être provoqué par les modifications allostériques du récepteur GABA-A, ce qui provoque l'ouverture du canal Cl⁻ et la réduction de l'hyperactivité neuronale associée à l'anxiété.

En revanche, au niveau intracérébral, au délai de vingt quatre heures et dans une moindre mesure, 5 semaines après l'arrêt du traitement, le diazépam restaure un niveau normal d'augmentation du taux de corticostérone dans le CPF associé au test d'AS. L'activité de l'axe corticotrope est régulée par des inhibiteurs et des mécanismes de rétroaction non-GCs, impliquant les voies GABAergiques (Calogero et al., 1988b, Arvat et al., 2002, Cullinan et al., 2008). Ceci pourrait expliquer l'effet du diazépam sur les niveaux de GCs. Le diazépam peut activer les récepteurs GABA centraux distribués dans l'HPC (Laviv et al., 2010, Lehner et al., 2010) et inhiber la libération d'ACTH (Makara and Stark, 1974), probablement par une action centrale sur l'hypothalamus, au niveau du PVN, via les neurones CRH (Cullinan et al., 2008). Cependant, au sein des animaux *Contrôle*, le traitement au diazépam tend à augmenter le taux de corticostérone intracérébrale. Des observations comparables ont déjà été réalisées, soit au sein de rats traités pendant 10 jours avec du diazépam (1mg/kg) (Chabot et al., 1982), soit après l'administration aiguë de diazépam à une forte concentration (10mg/kg) (Vargas et al., 2001) confirmant que les benzodiazépines peuvent induire une élévation de la concentration des GCs. En revanche, dans le cas particulier d'un sevrage à l'alcool et en accord avec nos données, le diazépam semble diminuer l'hyper-corticostéromie durable pendant le sevrage (Nava et al., 2007), au sein du CPF.

Pris dans leur l'ensemble, les résultats de ce dernier chapitre montrent un effet bénéfique du traitement au diazépam durant la période aigue du sevrage permettant d'empêcher l'émergence des troubles de MDT en réduisant les troubles anxieux, les altérations de l'axe corticotrope et en restaurant l'activité pCREB. Cependant, les effets du traitement à long-terme sont contrastés et sont moins marqués au sein du groupe *Sevré 6S* qu'au sein des *Sevré 1S*. Ainsi, l'action bénéfique du diazépam tend à s'estomper au cours du temps. Cette diminution pourrait être à l'origine du taux important de rechute observé dans les semaines qui suivent le sevrage à l'alcool.

Discussion générale et perspectives

L'objectif général de notre travail était d'une part, de déterminer quels rôles occupent les GCs dans l'émergence et le maintien des troubles anxieux et cognitifs après un sevrage à l'alcool. D'autre part, l'objectif était de spécifier l'importance des troubles anxieux induits par le sevrage en comparant les résultats des souris sevrées avec un modèle murin de stress chronique, également connu pour induire des troubles cognitifs sévères. Avant de revenir sur les résultats, nous avons souhaité apporter des informations plus précises sur notre modèle du sevrage à l'alcool, le modèle de SCLI permettant de modéliser la dépression et en ce qui concerne les aspects cognitifs, l'AS utilisée pour étudier la MDT chez le rongeur.

1. Modèle de sevrage à l'alcool

Dans un premier temps, nous avons discuté de la pertinence de notre protocole de sevrage à l'alcool pour reproduire les caractéristiques de la pathologie humaine. Ainsi, même si de nombreux aspects du sevrage à l'alcool observés chez l'homme restent à vérifier dans ce protocole, nous avons comparé les perturbations observées chez la souris avec les données obtenues en clinique. La comparaison a été réalisée en nous appuyant sur les trois critères qui déterminent la validité d'un modèle.

Le modèle a été construit en utilisant les facteurs étiologiques du syndrome de sevrage à l'alcool afin de correspondre au critère d'homologie. Les mécanismes biologiques dans les deux types de sevrage sont induits par des causes similaires correspondant à l'arrêt de la consommation chronique d'alcool. Ainsi, les symptômes observés sont provoqués par le manque d'alcool sur l'organisme après une période d'alcoolisation prolongée. La validité phénoménologique, c'est-à-dire la capacité du modèle à induire chez l'animal des modifications (physiologiques, comportementales, cognitives...) identiques à celles observées chez l'homme a également été vérifiée. Nos résultats confirment que notre modèle de sevrage à l'alcool induit des troubles de l'anxiété transitoire, des troubles cognitifs (notamment de la MDT), une hyperactivité transitoire de l'axe corticotrope, ainsi qu'une diminution de l'activité cérébrale (altération de la phosphorylation de CREB). Des altérations comparables ont été observées lors d'un sevrage à l'alcool chez l'homme. Ce modèle d'alcoolisation chronique et de sevrage reproduit également les lésions cérébrales observées chez les abstinents après une consommation massive et prolongée d'alcool. Des études anatomiques révèlent que 6 mois d'alcoolisation (15%) chronique produisent une diminution de la densité cellulaire substantielle dans les corps mamillaires de l'hypothalamus, en particulier de la région postérieure (25%), de l'HPC postérieur (11%) (Beracochea et al., 1987a) ainsi que des lésions des noyaux dorso-médian et antérieur du thalamus (Beracochea et al., 1987b). Une réduction modérée de la densité cellulaire est également observée dans le CPF (pour revue, Beracochea 2005). Au sein de l'HPC, la CCA (6 mois à 12%) entraîne une perte de neurones GABAergiques dans la région ventrale (Lescaudron et al., 1986) et l'alcoolisation modifie transitoirement le nombre et la morphologie des épines dendritiques des

neurones pyramidaux du CA1 (Lescaudron et al., 1989). En parallèle, des déficits de la MDT et de la MLT ainsi que des troubles anxieux ont été mis en évidence, à l'aide de ce modèle de sevrage (Beracochea, 2005). Nos données comportementales, neuroendocriniennes et moléculaires associées à ces données anatomiques témoignent de la pertinence de notre modèle. Enfin, nous avons également cherché à vérifier le troisième critère dit prédictif, à savoir si les traitements utilisés en clinique sont également efficaces sur notre modèle de sevrage à l'alcool. Le traitement le plus utilisé durant un sevrage à l'alcool chez l'homme consiste à administrer des benzodiazépines. Nous avons de ce fait, injecté de façon chronique du diazépam aux souris sevrées et nos données confirment que ce traitement induit de nombreux effets bénéfiques sur lesquels nous reviendrons.

2. Modèle de la dépression : le stress chronique imprédictible

Les nombreux travaux réalisés jusqu'à aujourd'hui montrent que ce modèle est vraisemblablement l'un des plus pertinents pour étudier la physiopathologie des troubles dépressifs, car il repose sur l'utilisation de facteurs étiologiques de la dépression : l'exposition chronique et imprédictible à des facteurs de stress socio-environnementaux. Le SCLI induit des altérations physiques, comportementales et cognitives : anhédonie, anxiété, modifications des interactions sociales, réduction de la prise de poids, diminution de la motivation à réaliser des activités autocentrées; ainsi que des altérations endocriniennes (Detanico et al., 2009, Palumbo et al., 2010, Surget et al., 2011), des altérations du taux de monoamines (Vancassel et al., 2008, Yalcin et al., 2008), une diminution de la prolifération cellulaire et de la neurogenèse hippocampique (Mineur et al., 2007, Surget et al., 2008, Surget et al., 2011). Comme nous le verrons par la suite, les données obtenues dans les différents travaux réalisés au cours de cette thèse apportent de nouveaux éléments, quant au respect du critère de validité descriptive. En effet, nos résultats confirment que le protocole de SCLI induit des troubles anxieux associés à une perturbation globale de la régulation de l'axe corticotrope aux niveaux plasmatique et intracérébral. Cette dérégulation est observable en conditions basale et test et se manifeste par des taux excessifs de corticostérone ainsi que par un déficit de rétrocontrôle. De plus, nos résultats montrent que la procédure de SCLI provoque des déficits cognitifs et plus particulièrement de la MDT, dans un test d'AS. Ces déficits sont accompagnés de troubles moléculaires notamment de la phosphorylation de CREB et de l'acétylation de l'histone H4, dans le CPF et l'HPC dorsal. Dans l'ensemble, ces données confortent la validité descriptive du modèle de SCLI et apportent de nouvelles preuves que cette procédure permet de reproduire des perturbations comparables à celles observées chez les dépressifs.

3. Modèle d'étude de la mémoire de travail

Le test d'AS a été utilisé comme outil pour déterminer l'impact du sevrage à l'alcool sur la MDT, une fonction dépendante du CPF et de l'HPC. Le test permet également de mesurer facilement l'effet d'un traitement pharmacologique sur les performances de MDT. Il a été choisi car il permet d'étudier les caractéristiques majeures de la MDT et repose sur un comportement robuste chez le rongeur, sans nécessiter de privation alimentaire.

D'un point de vue cognitif, les altérations de la MDT se caractérisent par une augmentation de la sensibilité aux interférences, principalement dues à une incapacité à supprimer les informations non pertinentes (Beracochea et al., 1987a, Gazzaley et al., 2005, Hogge et al., 2008). La mise au point d'un modèle d'étude de la MDT lors du sevrage à l'alcool se doit par conséquent de reproduire ces caractéristiques et doit permettre l'étude de l'effet de molécules thérapeutiques visant à pallier les déficits. Le protocole d'alternances séquentielles, en mesurant la capacité à alterner au cours d'une série d'essais successifs, permet d'étudier le jugement de récence lors d'un essai N, ainsi que le mécanisme d'effacement des informations non pertinentes (N-2, N-3, etc...) au profit de l'information cible (N-1), ce qui est un processus central de la MDT (Brito and Thomas, 1981, Thomas and Spafford, 1984). L'AS permet également de mesurer le poids des interférences entre les informations, en analysant l'effet de la place de l'essai dans la série et l'effet de la durée de l'IEE. Les performances reflètent ainsi la MDT des animaux (Beracochea and Jaffard, 1985, Lalonde, 2002, Chauveau et al., 2005).

L'utilisation du test d'AS, nous a permis de montrer que le sevrage à l'alcool et le SCLI, mais non l'alcoolisation, induisent une incapacité à gérer des informations séquentielles et une sensibilité accrue aux interférences. Nous avons également testé si les déficits des animaux *Sevré* et *SCLI* observés dans le test d'AS peuvent être induits par une baisse de la motivation à alterner. Pour cela, nous avons réalisé un huitième essai avec un délai IEE court de 5 secondes. Nos données ont montré que ni la procédure d'alcoolisation, de sevrage ou de SCLI, ni les traitements réalisés ne perturbent la motivation des animaux à alterner pour ce dernier essai, montrant clairement que la motivation à alterner n'est pas altérée par les traitements.

Enfin, la nature des informations utilisées a également été déterminée. Pour certains, l'alternance dans un labyrinthe en T reposerait sur une stratégie purement égocentrique (voire sensori-motrice), impliquant surtout une mémoire procédurale. Diverses études ont montré, en effet, que dans un protocole faisant appel à un renforcement alimentaire et des IEE très courts (de 0 à 5 sec), les souris peuvent utiliser une stratégie égocentrique pour réaliser l'épreuve, ce qui se traduit par un choix direct et par une latence de choix très courte. Or, dans notre épreuve, les IEE sont longs (90 sec), le comportement n'étant pas renforcé par une récompense, les souris effectuent de nombreux « allers-retours » dans le bras central du labyrinthe avant de choisir d'entrer dans un bras d'arrivée. Enfin, des expériences ont montré que la stratégie spatiale était bien utilisée dans l'alternance. Ainsi, nous avons

montré que, dans un labyrinthe en croix pourvu de deux bras de départ symétriques et opposés (Nord versus Sud) et de deux bras d'arrivée (Est-Ouest), si le départ lors du second essai (Nord, par exemple) était opposé à celui du premier essai (Sud), les souris entraient dans le bras d'arrivée opposé à celui choisi lors du premier essai. Ce résultat montre que les souris choisissent le bras d'arrivée à partir des indices allocentriques et non sur la base d'une stratégie égocentrique (Béracochéa, 1984).

4. Activation cérébrale lors de l'AS

Des études antérieures de l'équipe avaient mis en évidence l'implication spécifique du CPF et de l'HPC dans l'AS, par des techniques d'immunohistochimie de la protéine CREB démontrant une activation neuronale au sein de ces structures. En revanche, cette même étude avait montré que l'amygdale (noyau basolatéral) et le striatum n'étaient pas activés durant le test d'AS (Vandesquille et al., 2013). Cette observation confirme les résultats obtenus par des approches lésionnelles démontrant l'implication du CPF et de l'HPC dans la MDT et l'AS (Stevens and Cowey, 1973, Divac, 1975, Dalland, 1976, Delatour and Gisquet-Verrier, 1996) et renforcent l'hypothèse de l'utilisation d'une stratégie spatiale HPC-dépendante (Egger, 1973, Dalland, 1976). Nos résultats confirment l'ensemble de ces résultats, en montrant une activation de CREB dans le CPF et la région dorsale du CA1 de l'HPC, mais non au sein de la région ventrale. Ces résultats corroborent certaines données qui dissocient l'HPC en plusieurs régions ayant des fonctions distinctes, la région dorsale ayant un rôle «cognitif» et la région ventrale ayant une implication plus importante dans les comportements émotionnels (Fanselow and Dong, 2010, Segal et al., 2010). Cette donnée est en accord avec les résultats des travaux antérieurs de l'équipe énoncés plus haut, montrant que l'état émotionnel des animaux *Contrôle* ne semble pas impliqué dans le test comme l'indique l'absence d'augmentation de la phosphorylation de CREB dans l'amygdale dans les travaux de Vandesquille (2013).

Les profils d'acétylation des histones H3 et H4 ont également été analysés après le test d'AS. Chez les souris *Contrôle*, le profil d'activation de H4 reproduit celui de pCREB suggérant que la protéine CREB et l'acétylation de H4 pourraient faire partie de la même cascade de signalisation. La protéine CBP a été proposée pour induire l'acétylation des histones. En effet, CBP possède une activité histone-acétylase pouvant induire l'acétylation des résidus lysines présents aux extrémités N-terminales des quatre histones du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4). Elle est régulée par la PKA, qui permet sa liaison avec CREB (Chrivia et al., 1993) ou encore par la voie des MAPK, ce qui aboutit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Janknecht and Nordheim, 1996). Ainsi, la perturbation de CREB pourrait être à l'origine du déficit d'acétylation de H4. Ce phénomène pourrait être impliqué dans les changements neuroadaptatifs d'expression de gènes qui se développent après une CCA (Pandey et al., 2008, Qiang et al., 2011, Pascual et al., 2012, Ponomarev et al., 2012). Cependant, nos résultats montrent que l'augmentation d'Ac-H4 ne semble pas nécessaire à la

réalisation de la tâche de MDT puisque les souris *Alcool* présentent un déficit d'Ac-H4 alors que la MDT est préservée. L'acétylation de H4 pourrait cependant avoir un rôle fonctionnel dans les tâches de MLT avec une composante spatiale. Des perturbations d'Ac-H4 dans l'HPC dorsal ont déjà été impliquées dans des tests de mémoire spatiale hippocampo-dépendant, chez la souris (Peleg et al., 2010, Dagnas et al., 2013, Dagnas and Mons, 2013) et le rat (Bousiges et al., 2010, Zeng et al., 2011, Castellano et al., 2012).

Sur le plan neuroendocrinien, le test d'AS induit également l'activation de l'axe corticotrope. En effet, le test provoque l'augmentation significative de la concentration de corticostérone plasmatique et intracérébrale. Dans le CPF et l'HPC dorsal, l'augmentation des taux de corticostérone est homogène entre les deux structures et est significative entre 15 et 60 minutes après le début du test avant de revenir à un niveau basal. La comparaison de l'activation de l'axe corticotrope induite par le test d'AS, avec des résultats de données précédentes mesurant les niveaux de corticostérone après un stress de choc électrique aux pattes, montre que la procédure comportementale du test d'AS induit une augmentation des concentrations intracérébrales de corticostérone plus courte (de 15 à 60 minutes) que celles observées après un stress de choc électrique aux pattes (de 15 à 90 minutes) (Minni et al., 2012, Dominguez et al., 2014). Cette différence confirme les travaux de Koolhass (1997 et 2011) qui montrent que l'ampleur et la durée de la réponse des GCs suite à l'activation de l'axe corticotrope sont dépendantes du type de stress.

5. Perturbations des profils d'activations moléculaires et neuroendocriniens induits par le sevrage

Nos résultats ont montré que par rapport aux souris *Contrôle* et *Alcool*, le sevrage induit des perturbations spécifiques des différents systèmes moléculaires et neuroendocriniens activés durant le test de MDT, au sein du CPF et de l'HPC. En effet, parallèlement à la diminution des performances d'alternance, les immunohistochimies de pCREB et d'Ac-H4 révèlent une diminution de l'activation de CREB (pCREB) et d'H4 (Ac-H4) induite par le test dans le CPF et le CA1 dorsal chez les souris *Sevré*. En revanche, l'alcoolisation, qui n'engendre pas de déficit de MDT, induit des perturbations de pCREB exclusivement dans le CA1 dorsal (et non dans le CPF), ainsi que d'Ac-H4 dans les deux structures. Ces résultats suggèrent que l'altération de la phosphorylation de CREB dans le CPF est responsable de l'émergence et du maintien des altérations de la MDT durant un sevrage à l'alcool.

Au vu de l'action neurotoxique de l'alcool, nous avons cherché à déterminer si les diminutions des comptages de noyaux par mm² de pCREB et d'Ac-H4 peuvent être expliquées uniquement par des pertes cellulaires dans les régions corticale et hippocampique. Pour cela, une étude histologique préliminaire a été réalisée afin de quantifier la perte cellulaire dans le CPF. Les données

(annexe 2) montrent que l'alcoolisation induit une perte cellulaire de 5%, accentuée par le sevrage (9%). D'une autre part, des études antérieures ont révélé que 6 mois d'alcoolisation engendraient une perte cellulaire inférieure à 8.5% au sein de l'HPC dorsal (Lescaudron and Verna, 1985), des valeurs insuffisantes pour expliquer l'absence totale d'activation de pCREB après un test d'AS dans le CPF et le CA1 dorsal. D'autre part, le nombre de noyaux marqués en condition naïve chez les animaux *Sevré* est toujours comparable voire supérieur au nombre de noyaux marqués au sein du groupe *Contrôle* quelles que soit la structure ou la protéine analysées. Au vu de ces deux constats, nous avons exclu l'hypothèse que les pertes cellulaires puissent rendre compte de la diminution des marquages immunohistochimiques. Les diminutions de pCREB et d'Ac-H4 reflètent donc un déficit d'activité cérébrale induite par le test et le sevrage à l'alcool ou le SCLI.

Les déficits d'activités pCREB observés au sein de nos souris sevrées, sont à rapprocher des données obtenues chez l'homme par imagerie fonctionnelle décrivant des modifications des profils d'activation cérébrale après un sevrage à l'alcool. Ces études montrent une diminution de l'activité préfrontale chez les sujets abstinents et la mise en place de mécanismes compensatoires (Moselhy et al., 2001, Pfefferbaum et al., 2001, Jung and Metzger, 2010, O'Daly et al., 2012). De plus, nos données s'accordent à celles obtenues chez l'homme sur le lien essentiel entre la réduction d'activation préfrontale et les altérations des performances de MDT observées lors du sevrage (Sullivan et al., 1993, Sullivan et al., 2000a).

Une approche pharmacologique a montré que l'augmentation de pCREB à l'aide d'une injection ip de rolipram ou d'une injection intra-CPF de Sp-cAMPS a un effet bénéfique sur les performances de MDT au sein des souris sevrées. Ces résultats ont permis de démontrer un lien direct entre le déficit de phosphorylation de CREB et les performances de MDT. Les données témoignent également du rôle majeur du CPF dans la réalisation de la tâche d'AS puisque les injections de Sp-cAMPS dans l'HPC dorsal n'ont aucun effet sur les performances.

Dans cette même expérience, nous avons également démontré que l'augmentation excessive de la phosphorylation de la protéine CREB dans le CPF induit une diminution des performances de MDT des souris *Contrôle*. Ces résultats confirment qu'une activation aberrante et soutenue de la voie AMPc/PKA/CREB peut conduire à des déficits cognitifs (Belanoff et al., 2002, Ramos et al., 2003, Giralt et al., 2011). Par exemple, dans le cas du vieillissement normal, la désinhibition de l'activité de CREB dans le CPF, induit une diminution des performances de MDT (Vandesquille et al., 2013). De même, l'augmentation pharmacologique de l'activité de CREB dans le CPF induit des troubles de la MDT chez des souris jeunes (Ramos et al., 2003, Runyan and Dash, 2005).

Notre protocole de sevrage à l'alcool induit également des troubles anxieux durant la phase aiguë du sevrage, mais qui ne sont pas observés après 6 semaines de sevrage, démontrant le caractère transitoire de ces symptômes. Ces résultats sont en accord avec les études cliniques. De même, l'augmentation excessive du niveau plasmatique de corticostérone induite par le test d'AS est

transitoire et n'est plus observée après 6 semaines de sevrage. Ainsi, nos données endocriniennes sont en accord avec les données comportementales. La voie de signalisation AMPc/PKA/CREB semble également impliquée dans le développement des troubles anxieux durant la période de sevrage aigu. En effet, l'injection de rolipram permet de réduire l'anxiété des souris *Sevré IS*, confirmant de nombreux travaux sur le rôle de CREB dans l'anxiété (Pandey, 2003, Duman and Duman, 2005, Wand, 2005, Kerner et al., 2013).

Au niveau intracérébral, les résultats de microdialyse montrent une augmentation excessive du taux de corticostérone en situation comportementale dans le CPF spécifiquement, notamment 30 minutes après le début du test. Comme discuté précédemment, des altérations régionales des taux de corticostérone après un sevrage durable ont déjà été reportées (Little et al., 2008). Ces différences pourraient être induites par une perturbation de la biosynthèse de la corticostérone et par une synthèse locale de GCs dans des tissus autres que les glandes surrénales (Davies and MacKenzie, 2003). Cette hypothèse suggère que les HSD-1, notamment localisés dans le CPF (Moisan et al., 1990, Sakai et al., 1992, Seckl and Walker, 2001) réactiverait la corticostérone à partir de la 11-déhydrocorticostérone inactive, et pourraient moduler localement l'action des GCs dans le CPF.

En revanche, l'absence d'effet de l'alcoolisation sur les taux de corticostérone et la réactivité de l'axe corticotrope pourrait rendre compte d'un phénomène de neuroadaptation et de tolérance durant la consommation chronique d'alcool. Cette observation est confortée par des études montrant que les changements de l'équilibre physiologique de l'axe corticotrope entraînent une diminution de sa réceptivité durant une CCA (Koob and Le Moal, 2001, King et al., 2006)

L'implication des GCs dans l'émergence et le maintien des troubles de la MDT chez les animaux sevrés a été testée via l'injection d'un inhibiteur de la synthèse de corticostérone, la métyrapone. Les résultats confirment qu'en l'absence de l'augmentation du taux de corticostérone, les souris sevrées ne présentent ni trouble de la MDT ni déficit d'activation de CREB. De plus, le blocage pharmacologique spécifique des MR ou des GR in situ dans le CPF, a permis de mettre en évidence, l'implication spécifique des récepteurs MR dans l'action délétère de la corticostérone sur la MDT. Ces résultats confirment une implication spécifique du CPF dans le développement des troubles de la MDT puisque seule l'injection in situ dans le CPF de spironolactone et non dans l'HPC dorsal a un effet sur les performances des animaux sevrés.

Perspectives

Caractérisation des altérations de l'axe corticotrope

- Afin de vérifier l'hypothèse d'une synthèse locale responsable des taux anormalement élevés de corticostérone, pendant et après le test d'AS après un sevrage à l'alcool, nous voudrions quantifier les HSD-1 et la 11-déhydrocorticostérone dans le CPF et l'HPC. En effet, l'augmentation de la corticostérone excessive et localisée spécifiquement dans le CPF pourrait être provoquée par une activité anormale des HSD-1 induite par l'alcoolisation et/ou le sevrage à l'alcool, ainsi il serait intéressant de quantifier cette enzyme ainsi que la 11-déhydrocorticostérone.

- L'alcoolisation chronique diminue dans le CPF et l'HPC, les taux de récepteurs GR mais le sevrage normalise cette réduction uniquement dans l'HPC, alors qu'elle est maintenue dans le CPF après le sevrage (Roy et al., 2002). Cette perturbation pourrait rendre compte des troubles des fonctions cognitives dépendantes du CPF et de l'implication plus spécifique des MR dans le développement des déficits de MDT. Ainsi nous souhaiterions étudier, à l'aide de la technique de Western blot, si dans notre modèle de sevrage un déséquilibre des taux des récepteurs MR et GR est observé dans le CPF et l'HPC (dorsal et ventral) des souris sevrées.

Spécifier l'impact des perturbations épigénétique sur la mémoire à long terme

Les altérations cognitives induites par le sevrage à l'alcool ne se limitent pas aux troubles de la MDT ; des perturbations de la MLT sont également observées (Farr et al., 2005, Jacquot et al., 2008). Nous avons précédemment démontré que les processus d'acétylation des histones sont altérés dans le cas d'un sevrage à l'alcool (Pandey et al., 2008, Moonat et al., 2010, Mizuo et al., 2012, Pascual et al., 2012, Arora et al., 2013). Ces modifications d'acétylation des histones représentent un mécanisme majeur du contrôle de la transcription des gènes impliqués dans la formation de la MLT. Ainsi, une perspective serait d'étayer l'hypothèse d'une implication fonctionnelle de l'altération de l'histone H4 lors de la consolidation dans une forme de mémoire spatiale à long-terme, dépendante de l'HPC. Dans un premier temps, une approche comportementale pourrait être utilisée afin de mettre en évidence des troubles de la MLT. Puis, à l'aide d'une approche pharmacologique visant à inhiber les histones déacétylases dans l'HPC, l'implication de l'acétylation des histones dans le développement de troubles de MLT et des fonctions sous-tendues par l'HPC pourrait être examinée. L'état d'acétylation/déacétylation des histones étant un processus réversible, il constitue une cible thérapeutique privilégiée afin de pallier les dysfonctionnements mnésiques liés au sevrage à l'alcool. Des études sur les déficits cognitifs induits par le vieillissement ont déjà montré que des inhibiteurs des histones déacétylases permettaient de réduire les déficits de mémoire en conditionnement de peur

au contexte et en reconnaissance d'objet (Haggarty and Tsai, 2011, Stilling and Fischer, 2011) ou en piscine de Morris (Dagnas et al., 2013) chez les souris âgées.

6. Perturbations des profils d'activations moléculaires et neuroendocriniens induits par le SCLI

Afin de comparer les altérations induites par le sevrage, de celles induites par le SCLI, nous avons réalisé en parallèle, une étude portant sur des souris soumises à la procédure de SCLI. L'impact de cette procédure a été analysé aux niveaux comportemental, moléculaire et neuroendocrinien.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de confirmer que la procédure de SCLI affecte l'état physique des souris notamment à partir de la quatrième semaine de stress. Une réduction de la prise de poids ainsi qu'une détérioration de l'état du pelage sont observées démontrant une diminution des activités autocentrées. Ces troubles s'accompagnent d'une augmentation de l'anxiété mesurée dans le test du labyrinthe en croix surélevé et d'un comportement de néophobie excessif et persistant dans un environnement nouveau. Les modifications décrites ici peuvent correspondre à différents aspects de la symptomatologie dépressive. Les altérations induites par la procédure de SCLI ont largement été décrites (Surget et Belzung, 2009) et nos observations corroborent ces données. L'effet anxiogène du SCLI a également été démontré dans d'autres études notamment à l'aide du labyrinthe en croix surélevé (Bondi et al., 2008, Zhu et al., 2014).

Le SCLI modélise également les perturbations de l'axe corticotrope, caractéristiques de la dépression (Nemeroff, 1996, Holsboer, 2000, Pariante and Miller, 2001):

- une augmentation du taux basal de corticostérone plasmatique
- l'hyper réactivité de l'axe corticotrope observable aux niveaux plasmatique et intracérébral (CPF et HPC dorsal) après le test d'AS
- un déficit de rétrocontrôle négatif se traduisant par le maintien des taux élevés de corticostérone après le test d'AS

L'effet délétère de la procédure de SCLI sur le rétrocontrôle avait déjà été mis en évidence à l'aide du test de suppression à la dexaméthasone (Nollet et al., 2012). Nos données permettent de mettre en évidence ce déficit au niveau intracérébral, avec une plus grande spécificité locale et temporelle. Nos données confirment ainsi que le protocole de SCLI permet de modéliser les altérations de l'axe corticotrope induites par la dépression.

En parallèle aux perturbations des taux de GCs, des déficits de MDT ont été modélisés dans un test d'AS. De façon comparable, de précédentes études ont montré que le SCLI engendre des troubles de la MDT, dans le test d'AS pour un IEE supérieur ou égal à 30 secondes (Mizoguchi et al., 2000). Dans notre étude, les troubles de la MDT induits par le SCLI se traduisent par une sensibilité

accrue aux interférences proactives. Cette altération permet de reproduire les troubles cognitifs observés chez les patients dépressifs. En effet, la détérioration des performances de MDT est une donnée clinique classique, et de nombreuses études cliniques rapportent une diminution des performances de MDT chez les sujets dépressifs (Pelosi et al., 2000, Harvey et al., 2004, Christopher and MacDonald, 2005, Rose and Ebmeier, 2006).

Associé à l'altération de la MDT, nous avons observé au niveau moléculaire un déficit d'activation de CREB et d'H4 dans le CPF et le CA1 dorsal au sein des souris *SCLI*. La diminution de l'activité de CREB chez les souris *SCLI* est en accord avec des données cliniques montrant une importante baisse du métabolisme cérébrale chez des patients dépressifs (Hurwitz et al., 1990, Martinot et al., 1990, Kumar et al., 1993, Ito et al., 1996, Videbech, 2000). Les études post-mortem rapportent également une diminution des taux de CREB chez des suicidés (Dwivedi et al., 2003a, Dwivedi et al., 2003b, Yamada et al., 2003). Le facteur de transcription CREB pourrait également être impliqué dans l'émergence des troubles anxieux et de la dépression ainsi que dans les mécanismes d'action des antidépresseurs (Nibuya et al., 1995, Blendy, 2006). En effet, comme précédemment évoqué, une diminution de CREB induit des comportements de type anxieux. A l'inverse, la surexpression de CREB dans le gyrus denté entraîne un effet antidépresseur dans des modèles de dépression chez le rat (Chen et al., 2001). L'implication de CREB dans l'anxiété est également renforcée par nos résultats montrant que l'injection aigue de rolipram diminue l'anxiété des souris *Sevré IS* et *SCLI* dans le labyrinthe en croix surélevé. De plus, il a été montré que les patients répondant le mieux aux traitements médicamenteux ont une augmentation significative de pCREB, suggérant que l'action des antidépresseurs pourrait être soutenue par le facteur CREB (Koch et al., 2002). En parallèle, des études d'imagerie fonctionnelle ont montré que les patients dépressifs répondants aux traitements médicamenteux présentent une restauration de l'activité cérébrale au sein du CPF dorsolatéral. La diminution de l'activité du CPF serait donc un marqueur d'état, dans la mesure où ces anomalies disparaissent chez les patients répondant aux traitements médicamenteux (Brody et al., 1999).

Certaines hypothèses suggèrent que les altérations du CPF durant la dépression pourraient être secondaires au niveau élevé de GCs. Les GCs pourraient notamment perturber les fonctions cérébrales en inhibant le BDNF, d'après des études réalisées chez les rongeurs (Smith et al., 1995, Suri and Vaidya, 2013). La diminution du BDNF dans les états de stress chronique pourrait induire une diminution des efférences hippocampiques vers le CPF. Ainsi, l'augmentation de la concentration en GCs diminuerait la connectivité synaptique hippocampique (méta-plasticité négative), alors qu'une augmentation de l'expression du BDNF l'augmente (méta-plasticité positive) (Garcia, 2002).

Dans l'ensemble, ces données apportent de nouvelles preuves de la validité prédictive du modèle de *SCLI* et attestent de l'action délétère des GCs sur la voie de signalisation CREB et sur la MDT.

7. Comparaison des altérations induites par le sevrage et le SCLI

Au vu de l'importante comorbidité entre le sevrage à l'alcool et la dépression observée en clinique, nous avons cherché dans cette étude à déterminer si le sevrage à l'alcool induit des troubles anxieux, moléculaires et neuroendocriniens, comparables à ceux observés lors d'une dépression sans complication de dépendance à l'alcool. Cette comparaison pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la physio-pathogénèse et l'étiologie de la dépression lors d'un sevrage.

Comme nous l'avons précédemment décrit, le sevrage à l'alcool comme le SCLI induisent des troubles anxieux comparables. En revanche, à l'inverse du sevrage, le SCLI engendre une dégradation de l'état physique des souris (réduction de la prise de poids et altération de l'état du pelage) et altère profondément la régulation de l'axe corticotrope dans sa globalité. En effet, le SCLI entraîne une augmentation du taux basal de corticostérone plasmatique, l'hyper-réactivité de l'axe corticotrope aux niveaux plasmatique et intracérébral (CPF et HPC dorsal) ainsi qu'un déficit de rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope. En revanche, le sevrage à l'alcool n'affecte que transitoirement le taux de corticostérone plasmatique après le test d'AS et induit de façon durable une augmentation excessive du taux de corticostérone après le test au sein du CPF et non de l'HPC dorsal. Ce résultat suggère un moindre impact du sevrage sur la régulation de l'axe corticotrope que le SCLI. En revanche, ces résultats mettent en évidence une perturbation locale et spécifique du CPF par le sevrage à l'alcool mais non un trouble global de la régulation de l'axe corticotrope.

La comparaison des deux modèles a en revanche montré une grande similitude des perturbations moléculaires de CREB et d'H4 au sein du CPF. Ces perturbations se traduisent, en effet, dans les deux cas par un déficit de phosphorylation de CREB et d'acétylation de H4. Le déficit de phosphorylation de CREB semble être impliqué, au sein des deux groupes, dans l'émergence des troubles anxieux et de MDT. En effet, l'augmentation pharmacologique de pCREB via l'injection de rolipram restaure les performances de MDT et un niveau normal d'anxiété. La similitude des perturbations moléculaires au sein du CPF, pourrait donc être due à l'action inhibitrice de l'augmentation excessive du taux de corticostérone sur la phosphorylation de CREB. Les résultats immunohistochimiques de pCREB obtenus après l'injection de métyrapone renforcent cette hypothèse. En effet, l'inhibition de la synthèse de corticostérone restaure pCREB dans le CPF chez les animaux *Sevré* et *SCLI* et dans une moindre mesure (mais de façon non significative) dans le CA1 dorsal chez les animaux *SCLI*. La métyrapone pourrait restaurer l'activité de CREB uniquement dans les structures où les taux de corticostérone sont excessifs.

Pour conclure, nos résultats font émerger une différence majeure entre les troubles induits par le sevrage ou par le SCLI. Dans le cas du SCLI, les altérations de l'axe corticotrope semblent globales et être à l'origine de l'émergence des troubles du CPF et des fonctions qui en dépendent. En revanche, le sevrage à l'alcool induit à long terme une altération spécifique des taux de corticostérone dans le

CPF. Malgré cette distinction, dans les deux cas, les perturbations des taux de GCs engendrent une dérégulation des fonctions dépendantes du CPF via une altération de l'activité de CREB.

8. Hypothèses du mécanisme d'action des GCs sur pCREB

L'approche pharmacologique visant à réduire les troubles de MDT, induits par le sevrage ou le SCLI, via une injection aigue de métyrapone a montré que l'amélioration des performances de MDT s'accompagne d'une amélioration de l'activité de pCREB, au sein du CPF. A l'inverse, l'augmentation pharmacologique du taux de corticostérone chez les souris *Contrôle* perturbe la MDT et diminue la phosphorylation de CREB dans le CPF. Ces deux expériences nous ont permis de confirmer l'existence d'un lien direct entre les performances de MDT, l'activité de CREB et les taux de corticostérone au sein du CPF spécifiquement. De plus, l'amélioration des performances de MDT des souris sevrées après une injection aigue de spironolactone, au sein du CPF, confirme l'implication spécifique des MR dans la médiation des effets délétères des GCs sur la MDT au cours d'un sevrage à l'alcool. Au vu de ces résultats et des données de microdialyse, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation excessive de corticostérone dans le CPF en situation comportementale inhibe, principalement via les MR, la phosphorylation de CREB, ce qui serait à l'origine des altérations de la MDT durant le sevrage à l'alcool.

Cependant, nos résultats ne nous permettent pas actuellement de déterminer quel médiateur intracellulaire perturbe la phosphorylation de CREB. Dans la littérature, plusieurs médiateurs ont été proposés qui pourraient être responsables de l'action inhibitrice des GCs sur CREB. Dans sa revue, Moonat (2010) propose trois médiateurs impliquant différentes voies de signalisation potentielle pour expliquer l'effet de l'alcool sur CREB : la PKA, la protéine ERK1/2 et la CaMKIV. Ces protéines sont impliquées dans trois voies de signalisations différentes pouvant induire des modifications de l'état de phosphorylation de CREB. En effet, des nombreuses études rapportent que la PKA (Delghandi et al., 2005, Moisan et al., 2014), ERK1/2 (Chen et al., 1992, Zanassi et al., 2001, Trifilieff et al., 2006) ou la CaMK (Sun et al., 1994) modifient la phosphorylation de CREB.

Si l'alcoolisation aigue perturbe l'activité de la PKA dans les régions corticales et l'amygdale, la consommation chronique d'alcool et le sevrage n'ont pas d'effet sur son activité (Pandey et al., 2001, Pandey et al., 2003). De plus, et à l'inverse de nos résultats montrant l'effet inhibiteur des GCs sur pCREB, certaines études mentionnent que les GCs activent la PKA et donc augmentent pCREB. Ces données suggèrent que les GCs pourraient inhiber pCREB par une autre voie de signalisation. Cependant, la voie AMPc/ PKA est particulièrement impliquée dans la régulation des comportements anxieux ainsi que dans la régulation des fonctions mnésique. Pour ces deux raisons et au vu des résultats obtenus avec les injections du rolipram ou du Sp-cAMPS, la voie de signalisation

AMPC/PKA apparaît comme une bonne cible thérapeutique pour diminuer les comportements anxieux associés au sevrage et réduire les troubles cognitifs.

En revanche, des études ont reporté que le sevrage induit une diminution de la protéine ERK1/2 dans l'amygdale (Pandey et al., 2008) et une diminution de la CaMKIV dans les régions corticales et amygdaliennes (Pandey et al., 2001, Pandey et al., 2003).

L'action des GCs sur ERK1/2 semble dépendre de la durée du stress. En effet, la corticostérone peut induire, *in vitro*, une activation rapide d'ERK1/2 (Qiu et al., 2001) et de façon équivalente, un stress aigu de nage forcée, augmente la phosphorylation de ERK1/2, dans l'HPC, le CPF et le striatum (Shen et al., 2004). De même, l'exposition unique à un stress de contention (30 min) accroît également pERK1/2 dans l'HPC, le cortex cingulaire et le CPF (Meller et al., 2003). En revanche, un stress chronique de contention (11 jours) ou de nage forcée (14 jours) réduit les niveaux de pERK1/2, dans l'HPC et le CPF (Meller et al., 2003, Qi et al., 2008). Des résultats comparables ont également été obtenus, dans le locus coeruleus et le bulbe rachidien chez le rat après un stress chronique de contention (Imbe et al., 2004). En accord avec ces données, il a été montré qu'un traitement chronique aux GCs provoque la diminution de pCREB sur des neurones en culture cellulaire (Focking et al., 2003). Ainsi, le stress prolongé induit par le sevrage à l'alcool ou le SCLI pourrait induire une diminution de pERK1/2 à l'origine du déficit d'activation de CREB.

D'autre part, des études ont montré que les GCs peuvent moduler pCREB via la protéine kinase CaMKIV et la protéine phosphatase calcineurine, deux protéines sensibles aux variations de calcium intracellulaire. En effet, les travaux de Grossmann (2010), montrent que les GCs entraînent une diminution de la phosphorylation de CREB, via les MR spécifiquement, en recrutant la calcineurine. La CaMKIV et la calcineurine agissent comme des régulateurs des processus d'apprentissage et de la mémoire. Ces deux types de protéines constituent des pivots essentiels à la plasticité synaptique et au stockage de la mémoire, et jouent des rôles opposés dans ces processus. En effet, la CaMKIV augmente la phosphorylation de CREB alors que la calcineurine la diminue.

De plus, il est reconnu que le sevrage à l'alcool provoque la diminution de CaMKIV sans altérer les niveaux de calcineurine (Pandey et al., 2001). Ce déséquilibre des mécanismes de phosphorylation/dephosphorylation de CREB pourrait être à l'origine du déficit d'activation de pCREB observé après le test de MDT chez les souris sevrées. De plus, des perturbations des niveaux de calcineurine ont déjà été impliquées dans les troubles de la MDT et des déficits de l'attention (Miyakawa et al., 2003).

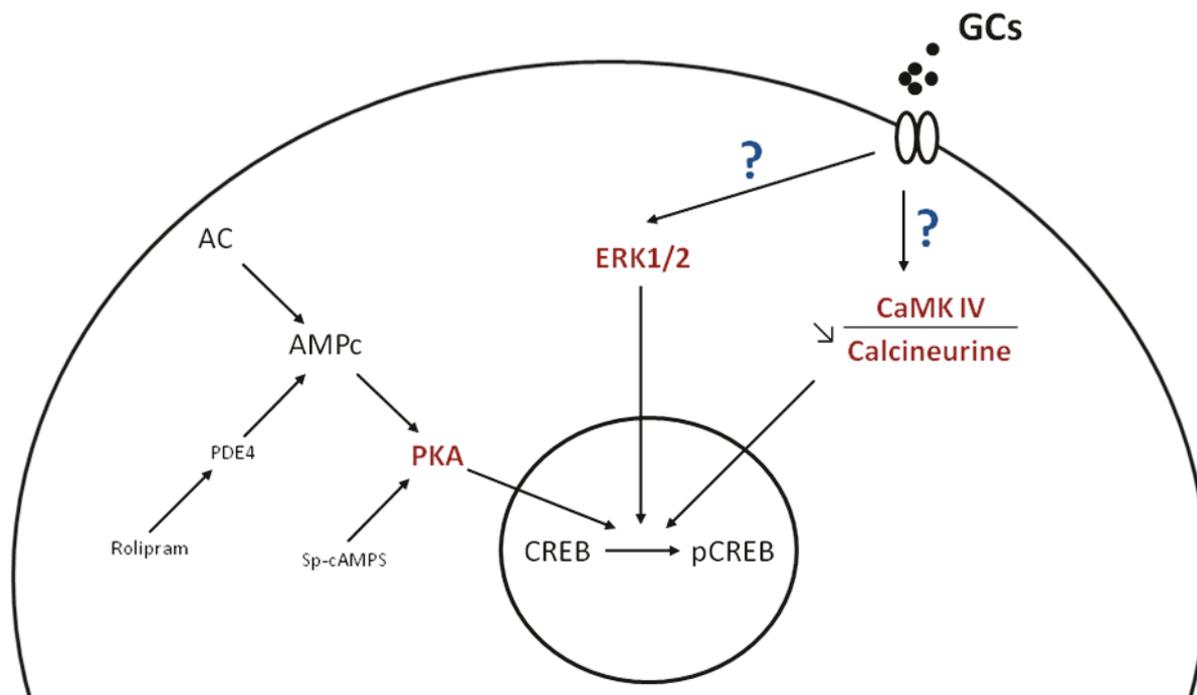


Figure 60 : schéma simplifié de l'action des GCs sur CREB durant le sevrage à l'alcool via différents potentiels médiateurs intracellulaire

Les GCs durant le sevrage à l'alcool pourraient induire une diminution de pCREB soit via un effet chronique sur ERK1/2 conduisant à son inhibition, soit via un déséquilibre de la balance CaMK IV/Calcineurine. En revanche, le sevrage ne semble pas diminuer la PKA mais l'augmentation pharmacologique de la voie AC / AMPc / PKA via l'injection de rolipram ou de Sp-cAMPS permet de réduire les troubles de MDT induits par le sevrage. AC : Adénylate Cyclase, AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique, PKA : Protéine Kinase A, ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases, CaMK IV : protéine Kinases Ca²⁺/Calmoduline-dépendantes IV.

L'ensemble de ces données suggère l'implication de la voie ERK1/2 et/ou de la voie CaMKIV/calcineurine (**Fig. 60**) dans la médiation des effets inhibiteurs des GCs sur la phosphorylation de CREB lors d'un sevrage à l'alcool. Cependant, l'augmentation de la voie AMPc/PKA apparait également comme une piste thérapeutique pour diminuer l'anxiété et les troubles cognitifs lors d'un sevrage à l'alcool.

Perspective

Bien que nos résultats établissent un lien direct entre les déficits de MDT et l'augmentation excessive du taux de corticostérone dans le CPF induisant un déficit de phosphorylation de CREB au cours d'un sevrage, le ou les médiateur(s) intracellulaire(s) reste(nt) mal défini(s). Dans ce but, des injections d'inhibiteurs sélectifs de CaMKIV et de la calcineurine en intra-CPF pourraient être réalisées afin de déterminer si leur inactivation permet de réduire les troubles de MDT et de pCREB chez les animaux sevrés. Ces expériences préliminaires pourraient être réalisées, dans un premier temps sur CaMKIV et la calcineurine. Dans un second temps et si les résultats ne sont pas concluants,

les implications d'ERK1/2 et de la PKA pourraient être étudiées, également via des injections d'inhibiteurs spécifiques.

Enfin, il serait également intéressant de quantifier, par western blot, dans le CPF et l'HPC dorsal, les formes actives de la CaMKIV ou de la calcineurine, en conditions naïve et test (après le test d'AS) sur des souris *Sevré* et *Contrôle* afin de déterminer l'impact du sevrage à l'alcool après une CCA sur ces messagers intracellulaires.

9. Traitement thérapeutique

Au cours de notre étude, différentes approches pharmacologiques ont été testées afin de réduire les troubles de la MDT induits par le sevrage à l'alcool. Notre première approche a été de rétablir pharmacologiquement l'activation de CREB pendant le test d'AS grâce à une injection aigue de rolipram ou à une injection in situ dans le CPF de Sp-cAMPS, deux activateurs de la voie AMPc/PKA/CREB. Cette approche a permis de réduire les troubles de la MDT chez les souris sevrées. De plus, l'augmentation des niveaux de pCREB pourrait également empêcher le développement des comportements de type anxieux associés au sevrage. Cependant deux limites majeures sont à noter. Premièrement, les injections de rolipram ne permettent pas de diminuer les taux élevés de corticostérone plasmatique durant le sevrage aigu et donc ce traitement ne permettra pas de protéger les fonctions cérébrales de l'effet délétère de l'augmentation excessive et prolongée des taux de GCs durant le sevrage aigu. De plus, l'augmentation périphérique et centrale de l'activité de la voie AMPc/PKA/CREB pourrait avoir des effets secondaires majeurs, du fait de l'expression ubiquitaire de CREB et des nombreuses implications de cette voie de signalisation dans les fonctions cérébrales.

Dans une deuxième partie, nous avons testé une approche pharmacologique ciblant l'axe corticotrope en inhibant la synthèse de corticostérone ou en bloquant spécifiquement les récepteurs MR grâce à l'injection de l'antagoniste spécifique. Ces deux pistes constituent des cibles thérapeutiques intéressantes, car les troubles de MDT, de pCREB ainsi que l'action délétère des GCs peuvent être réduits. Cependant nos résultats ne permettent pas de déterminer l'effet des traitements à la métyrapone ou à la spironolactone à long terme sur les différents paramètres moléculaires et neuroendocriniens. Des résultats encourageants ont déjà été obtenus à l'aide d'une injection unique de mifépristone, un inhibiteur de GR durant la phase aigue du sevrage sur l'hyperactivité comportementale induite par le stress et sur les performances de mémoire 10 jours après l'injection (Jacquot et al., 2008). Cependant, cette étude ne montre pas si des effets positifs sont observés sur CREB et les taux de corticostérone intracérébraux. L'ensemble de ces données confirme que l'action des GCs notamment durant la phase aigue du sevrage joue un rôle majeur dans le développement des déficits de mémoire durant la phase d'abstinence et conforte l'hypothèse que la diminution de la synthèse de corticostérone ou le blocage des récepteurs aux GCs pourraient être efficaces dans le

traitement des troubles cognitifs induits par le sevrage à l'alcool. Plus particulièrement, nos résultats démontrent que le blocage des MR permettrait de réduire les troubles de MDT.

Dans la dernière partie, nous nous sommes intéressés au traitement de première intention du sevrage aigu à l'alcool, les benzodiazépines et plus particulièrement le diazépam. L'efficacité d'un traitement chronique au diazépam a donc été testée sur les perturbations moléculaires et neuroendocriniennes qui nous ont semblé déterminantes dans l'émergence et le maintien des déficits de MDT après un sevrage à l'alcool. A court terme, le traitement chronique au diazépam réduit l'ensemble des troubles induits par le sevrage à l'alcool observé dans les chapitres précédents (anxiété, déficits de MDT et d'activation de CREB dans le CPF, augmentation excessive de la corticostérone pendant le test d'AS dans le CPF). Cependant, 5 semaines après l'arrêt du traitement au diazépam, les améliorations ne sont plus significatives. A long terme, le diazépam pourrait ne pas permettre d'empêcher le développement d'altérations moléculaires et neuroendocriniennes. De façon intéressante, une étude a rapporté que malgré le fait que les benzodiazépines soient efficaces dans le traitement du syndrome de sevrage de l'alcool, elles pourraient augmenter de manière non négligeable le risque de rechutes (DeBellis et al., 2005). Cependant, même si l'impact du diazépam sur le pourcentage de rechute n'a pas été clairement démontré, les études réalisées en milieu hospitalier confirment que les traitements actuels dont nous disposons ne permettent pas d'éviter la reprise de la consommation d'alcool après un sevrage. Ainsi, nous proposons une nouvelle piste d'étude pour diminuer l'émergence d'altérations moléculaires et neuroendocriniennes au sein du CPF à l'origine du développement de troubles cognitifs en réduisant le niveau des GCs ou en atténuant leurs actions sur les récepteurs MR durant la phase aiguë du sevrage.

10. Critique de l'étude

Une des critiques de cette étude est qu'elle ne permet pas de mettre en évidence les troubles cognitifs et/ou moléculaires induits par la période d'alcoolisation de 6 mois. En effet, le test comportemental choisi, mesurant la MDT, et les paramètres utilisés (IEE de 90 secondes) ne permettent pas de montrer les altérations induites par l'alcoolisation sur les fonctions cognitives. L'absence d'effet de l'alcoolisation est due au fait que le test d'AS et le protocole comportemental ont spécifiquement été choisis afin de révéler les troubles induits par la période de sevrage. Cependant, même si cette étude se concentre sur l'effet délétère du sevrage, de nombreuses études montrent qu'une telle période d'alcoolisation provoque des troubles cognitifs et moléculaires ainsi que des perturbations de l'organisation et de l'intégrité des structures cérébrales. Des troubles de la MLT ont notamment été observés après 6 mois d'alcoolisation (Béracochéa et al., 1987). Nos résultats vont également dans ce sens puisque des altérations de l'acétylation des histones ont été montrées dans cette étude chez les souris demeurées sous alcoolisation.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence que le sevrage à l'alcool et le SCLI produisent des troubles anxieux et de la MDT engendrés par un déficit de phosphorylation de CREB. Nos résultats montrent également que pCREB est inhibé par l'augmentation excessive des taux de corticostérone dans le CPF chez les souris *Sevré* et *SCLI*. De plus, la comparaison des souris *Sevré* avec les souris *SCLI* montre que le sevrage à l'alcool induit une altération spécifique et durable du CPF. En revanche, le SCLI engendre l'hyper-réactivité de l'axe corticotrope aux niveaux plasmatique et intracérébral.

Il semble possible de réduire les troubles cognitifs et la faible activation préfrontale en réduisant l'augmentation excessive des niveaux de GCs ou en inhibant les récepteurs MR, afin de rétablir un fonctionnement optimal de cette structure. Les récepteurs aux MR apparaissent comme une cible particulièrement intéressante pour restaurer les performances de MDT. Cependant, de plus amples études sont nécessaires pour identifier les médiateurs intracellulaires de l'action des GCs sur pCREB, ainsi que pour identifier les mécanismes responsables de la perturbation locale des taux de corticostérone dans le CPF durant le sevrage à l'alcool. Bien que nos résultats soulèvent de nombreuses questions, ils proposent de nouvelles pistes thérapeutiques pour le syndrome de sevrage.

Bibliographie

- Aalto S, Bruck A, Laine M, Nagren K, Rinne JO (Frontal and temporal dopamine release during working memory and attention tasks in healthy humans: a positron emission tomography study using the high-affinity dopamine D2 receptor ligand [11C]FLB 457. *J Neurosci* 25:2471-2477.2005).
- Abel T, Kandel E (Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev* 26:360-378.1998).
- Adinoff B, Martin PR, Bone GH, Eckardt MJ, Roehrich L, George DT, Moss HB, Eskay R, Linnoila M, Gold PW (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and cerebrospinal fluid corticotropin releasing hormone and corticotropin levels in alcoholics after recent and long-term abstinence. *Arch Gen Psychiatry* 47:325-330.1990).
- Adinoff B, Risher-Flowers D, De Jong J, Ravitz B, Bone GH, Nutt DJ, Roehrich L, Martin PR, Linnoila M (Disturbances of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning during ethanol withdrawal in six men. *Am J Psychiatry* 148:1023-1025.1991).
- Agartz I, Brag S, Franck J, Hammarberg A, Okugawa G, Svinhufvud K, Bergman H (MR volumetry during acute alcohol withdrawal and abstinence: a descriptive study. *Alcohol Alcohol* 38:71-78.2003).
- Aguilera G (Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15:321-350.1994).
- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K (High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science* 317:819-823.2007).
- Alberini CM (Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89:121-145.2009).
- Alexander JK, Hillier A, Smith RM, Tivarus ME, Beversdorf DQ (Beta-adrenergic modulation of cognitive flexibility during stress. *J Cogn Neurosci* 19:468-478.2007).
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. Hippocampal formation. In G. Paxinos: *The Rat Nervous System*. San Diego, Acad. Press Inc., 1995, 443-493p.
- Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (Previous experience with behavioral control over stress blocks the behavioral and dorsal raphe nucleus activating effects of later uncontrollable stress: role of the ventral medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 26:13264-13272.2006).
- Anthenelli RM, Maxwell RA, Geraciotti TD, Jr., Hauger R (Stress hormone dysregulation at rest and after serotonergic stimulation among alcohol-dependent men with extended abstinence and controls. *Alcohol Clin Exp Res* 25:692-703.2001).
- Arancibia-Carcamo IL, Kittler JT (Regulation of GABA(A) receptor membrane trafficking and synaptic localization. *Pharmacol Ther* 123:17-31.2009).
- Ardenghi P, Barros D, Izquierdo LA, Bevilaqua L, Schroder N, Quevedo J, Rodrigues C, Madruga M, Medina JH, Izquierdo I (Late and prolonged post-training memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. *Behav Pharmacol* 8:745-751.1997).
- Arnsten AF (Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci* 10:410-422.2009).

- Arnsten AF, Goldman-Rakic PS (Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch Gen Psychiatry* 55:362-368.1998).
- Arnsten AF, Wang MJ, Paspalas CD (Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* 76:223-239.2012).
- Arora DS, Nimitvilai S, Teppen TL, McElvain MA, Sakharkar AJ, You C, Pandey SC, Brodie MS (Hyposensitivity to gamma-aminobutyric acid in the ventral tegmental area during alcohol withdrawal: reversal by histone deacetylase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 38:1674-1684.2013).
- Arvat E, Giordano R, Grottoli S, Ghigo E (Benzodiazepines and anterior pituitary function. *J Endocrinol Invest* 25:735-747.2002).
- Aston-Jones G (Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Med* 6 Suppl 1:S3-7.2005).
- Atkinson R, Shiffrin R. Human memory: a proposed system and its control processes, In Spence K W, Spence J T. *Edition Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory*, New York, Academic Press, 1968, 89-195p.
- Aujla H, Beninger RJ (Hippocampal-prefrontocortical circuits: PKA inhibition in the prefrontal cortex impairs delayed nonmatching in the radial maze in rats. *Behav Neurosci* 115:1204-1211.2001).
- Austin MP, Mitchell P, Wilhelm K, Parker G, Hickie I, Brodaty H, Chan J, Eyers K, Milic M, Hadzi-Pavlovic D (Cognitive function in depression: a distinct pattern of frontal impairment in melancholia? *Psychol Med* 29:73-85.1999).
- Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5280-5285.1999).
- Bachmanov AA, Tordoff MG, Beauchamp GK (Ethanol consumption and taste preferences in C57BL/6ByJ and 129/J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 20:201-206.1996).
- Baddeley A, Hitch G *Working memory*. Bower, *The Psychology of Learning and Motivation*, 1974, 47-89p.
- Baddeley A (The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci* 4:417-423.2000).
- Baddeley A (Working memory. *Curr Biol* 20:R136-140.2010).
- Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT (CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 103:227-232.1991).
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP (Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17:245-261.1996).
- Barbas H, Blatt GJ (Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5:511-533.1995).
- Barbee JG (Memory, benzodiazepines, and anxiety: integration of theoretical and clinical perspectives. *J Clin Psychiatry* 54 Suppl:86-97; discussion 98-101.1993).
- Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B (Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16655-16660.2010).
- Bartsch AJ, Homola G, Biller A, Smith SM, Weijers HG, Wiesbeck GA, Jenkinson M, De Stefano N, Solymosi L, Bendszus M (Manifestations of early brain recovery associated with abstinence from alcoholism. *Brain* 130:36-47.2007).

- Baxter LR, Jr., Phelps ME, Mazziotta JC, Schwartz JM, Gerner RH, Selin CE, Sumida RM (Cerebral metabolic rates for glucose in mood disorders. Studies with positron emission tomography and fluorodeoxyglucose F 18. *Arch Gen Psychiatry* 42:441-447.1985).
- Beato M, Klug J (Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6:225-236.2000).
- Beatty WW, Hames KA, Blanco CR, Nixon SJ, Tivis LJ (Visuospatial perception, construction and memory in alcoholism. *J Stud Alcohol* 57:136-143.1996).
- Beatty WW, Katzung VM, Nixon SJ, Moreland VJ (Problem-solving deficits in alcoholics: evidence from the California Card Sorting Test. *J Stud Alcohol* 54:687-692.1993).
- Becker JT, Butters N, Hermann A, D'Angelo N (Learning to associate names and faces. Impaired acquisition on an ecologically relevant memory task by male alcoholics. *J Nerv Ment Dis* 171:617-623.1983).
- Belanoff JK, Jurik J, Schatzberg LD, DeBattista C, Schatzberg AF (Slowing the progression of cognitive decline in Alzheimer's disease using mifepristone. *J Mol Neurosci* 19:201-206.2002).
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112:503-510.1993).
- Bendszus M, Weijers HG, Wiesbeck G, Warmuth-Metz M, Bartsch AJ, Engels S, Boning J, Solymosi L (Sequential MR imaging and proton MR spectroscopy in patients who underwent recent detoxification for chronic alcoholism: correlation with clinical and neuropsychological data. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1926-1932.2001).
- Bengochea O, Gonzalo LM (Effect of chronic alcoholism on the human hippocampus. *Histol Histopathol* 5:349-357.1990).
- Beracochea Daniel. *Analyse et bases fonctionnelles des déficits mnésiques induits par la consommation chronique d'éthanol chez la souris BALB/c*. Thèse de 3e cycle, Université de Bordeaux 1, 1984.
- Beracochea D (Interaction between emotion and memory: importance of mammillary bodies damage in a mouse model of the alcoholic Korsakoff syndrome. *Neural Plast* 12:275-287.2005).
- Beracochea D, Jaffard R (Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 15:15-25.1985).
- Beracochea D, Lescaudron L, Tako A, Verna A, Jaffard R (Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice: a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res* 25:63-74.1987a).
- Beracochea D, Lescaudron L, Verna A, Jaffard R (Neuroanatomical effects of chronic ethanol consumption on dorsomedial and anterior thalamic nuclei and on substantia innominata in mice. *Neurosci Lett* 73:81-84.1987b).
- Beracochea D, Tronche C, Coutan M, Dorey R, Chauveau F, Pierard C (Interaction between Diazepam and Hippocampal Corticosterone after Acute Stress: Impact on Memory in Middle-Aged Mice. *Front Behav Neurosci* 5:14.2011).
- Bernardy NC, King AC, Parsons OA, Lovallo WR (Altered cortisol response in sober alcoholics: an examination of contributing factors. *Alcohol* 13:493-498.1996).
- Berridge KC, Fentress JC, Parr H (Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behav Brain Res* 23:59-68.1987).
- Berridge KC, Whishaw IQ (Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. *Exp Brain Res* 90:275-290.1992).
- Bharadwaj B, Bernard M, Kattimani S, Rajkumar RP (Determinants of success of loading dose diazepam for alcohol withdrawal: A chart review. *J Pharmacol Pharmacother* 3:270-272.2012).

- Birnbaum SG, Yuan PX, Wang M, Vijayraghavan S, Bloom AK, Davis DJ, Gobeske KT, Sweatt JD, Manji HK, Arnsten AF (Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. *Science* 306:882-884.2004).
- Bison S, Crews F (Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1173-1183.2003).
- Blendy JA (The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59:1144-1150.2006).
- Bondi CO, Rodriguez G, Gould GG, Frazer A, Morilak DA (Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology* 33:320-331.2008).
- Born J, Spath-Schwalbe E, Schwachenhofer H, Kern W, Fehm HL (Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 68:904-911.1989).
- Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier 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* 35:2521-2537.2010).
- Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL (Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 52:404-412.2002).
- Brandt J, Butters N, Ryan C, Bayog R (Cognitive loss and recovery in long-term alcohol abusers. *Arch Gen Psychiatry* 40:435-442.1983).
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268-276.2007).
- Breuner CW, Orchinik M (Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99-112.2002).
- Brito GN, Thomas GJ (T-maze alternation, response patterning, and septo-hippocampal circuitry in rats. *Behav Brain Res* 3:319-340.1981).
- Brody AL, Saxena S, Silverman DH, Alborzian S, Fairbanks LA, Phelps ME, Huang SC, Wu HM, Maidment K, Baxter LR, Jr. (Brain metabolic changes in major depressive disorder from pre- to post-treatment with paroxetine. *Psychiatry Res* 91:127-139.1999).
- Brown SA, Vik PW, Patterson TL, Grant I, Schuckit MA (Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. *J Stud Alcohol* 56:538-545.1995).
- Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS (Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205:929-932.1979).
- Brunner E (Stress and the biology of inequality. *BMJ* 314:1472-1476.1997).
- Buckingham JC (Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S258-268.2006).
- Buckley TM, Schatzberg AF (On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3106-3114.2005).
- Burette F, Jay TM, Laroche S (Synaptic depression of the hippocampal to prefrontal cortex pathway during a spatial working memory task. *Curr Psychol Lett* 1:9-23, 2000).
- Burke HM, Davis MC, Otte C, Mohr DC (Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 30:846-856.2005).
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G (Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychol Bull* 117:285-305.1995).

- Cagni P, Komorowski M, Melo GC, Lima T, Barros M (Diazepam-induced decrease in anxiety-like behaviors of marmoset monkeys exposed to a novel open-field. *Pharmacol Biochem Behav* 100:518-521.2012).
- Cahill L, McGaugh JL (Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21:294-299.1998).
- Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW (Catecholamine effects upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *J Clin Invest* 82:839-846.1988a).
- Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW (Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res* 463:28-36.1988b).
- Campbell SN, Zheng C, Monte L, Roe AD, Rice KC, Tache Y, Masliah E, Rissman RA (Increased Tau Phosphorylation and Aggregation in Mice Overexpressing Corticotropin-Releasing Factor. *J Alzheimers Dis.*2014).
- Cannon W. B. (Bodily changes in pain, hunger, fear and rage). New York, Appleton, 1929.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.2005).
- Carlson SL, Kumar S, Werner DF, Comerford CE, Morrow AL (Ethanol activation of protein kinase A regulates GABAA alpha1 receptor function and trafficking in cultured cerebral cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 345:317-325.2013).
- Carmichael ST, Price JL (Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 363:615-641.1995).
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386-389.2003).
- Cassano P, Lattanzi L, Soldani F, Navari S, Battistini G, Gemignani A, Cassano GB (Pramipexole in treatment-resistant depression: an extended follow-up. *Depress Anxiety* 20:131-138.2004).
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR (Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. *PLoS One* 7:e33249.2012).
- Cavada C, Llamas A, Reinoso-Suarez F (Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *Brain Res* 260:117-120.1983).
- Celerier A, Ognard R, Decorte L, Beracochea D (Deficits of spatial and non-spatial memory and of auditory fear conditioning following anterior thalamic lesions in mice: comparison with chronic alcohol consumption. *Eur J Neurosci* 12:2575-2584.2000).
- Cerqueira JJ, Pego JM, Taipa R, Bessa JM, Almeida OF, Sousa N (Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in prefrontal cortex-dependent behaviors. *J Neurosci* 25:7792-7800.2005).
- Chabot G, Brissette Y, Gascon AL (Relationship between plasma corticosterone and adrenal epinephrine after diazepam treatment in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 60:589-596.1982).
- Chanraud S, Martelli C, Delain F, Kostogianni N, Douaud G, Aubin HJ, Reynaud M, Martinot JL (Brain morphometry and cognitive performance in detoxified alcohol-dependents with preserved psychosocial functioning. *Neuropsychopharmacology* 32:429-438.2007).
- Chanraud S, Pitel AL, Rohlfing T, Pfefferbaum A, Sullivan EV (Dual tasking and working memory in alcoholism: relation to frontocerebellar circuitry. *Neuropsychopharmacology* 35:1868-1878.2010).
- Chauveau F, Celerier A, Ognard R, Pierard C, Beracochea D (Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. *Behav Brain Res* 156:215-223.2005).

- Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Beracochea D (Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207.2010).
- Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS (Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry* 49:753-762.2001).
- Chen RH, Sarnecki C, Blenis J (Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-927.1992).
- Chiba T, Kayahara T, Nakano K (Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res* 888:83-101.2001).
- Cho K, Little HJ (Effects of corticosterone on excitatory amino acid responses in dopamine-sensitive neurons in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 88:837-845.1999).
- Christopher G, MacDonald J (The impact of clinical depression on working memory. *Cogn Neuropsychiatry* 10:379-399.2005).
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855-859.1993).
- Chronister RB, White LE, Jr. (Limbic lobe morphology: an old approach to a new system. *Adv Neurol* 11:15-25.1975).
- Chrousos GP (Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-381.2009).
- Chrousos GP, Kino T (Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1179:153-166.2009).
- Chudasama Y (Animal models of prefrontal-executive function. *Behav Neurosci* 125:327-343.2011).
- Coffey CE, Wilkinson WE, Weiner RD, Parashos IA, Djang WT, Webb MC, Figiel GS, Spritzer CE (Quantitative cerebral anatomy in depression. A controlled magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 50:7-16.1993).
- Constantinescu A, Diamond I, Gordon AS (Ethanol-induced translocation of cAMP-dependent protein kinase to the nucleus. Mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 274:26985-26991.1999).
- Conway KP, Compton W, Stinson FS, Grant BF (Lifetime comorbidity of DSM-IV mood and anxiety disorders and specific drug use disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Clin Psychiatry* 67:247-257.2006).
- Corkin S (What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* 3:153-160.2002).
- Cullinan WE, Ziegler DR, Herman JP (Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct* 213:63-72.2008).
- Curran HV (Benzodiazepines, memory and mood: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 105:1-8.1991).
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12796-12801.2001).
- D'Esposito M, Postle BR, Ballard D, Lease J (Maintenance versus manipulation of information held in working memory: an event-related fMRI study. *Brain Cogn* 41:66-86.1999a).
- D'Esposito M, Postle BR, Jonides J, Smith EE (The neural substrate and temporal dynamics of interference effects in working memory as revealed by event-related functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7514-7519.1999b).
- Dagnas M, Guillou JL, Prevot T, Mons N (HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *J Neurosci* 33:1954-1963.2013).

- Dagnas M, Mons N (Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus* 23:581-591.2013).
- Dalland T (Response perseveration of rats with dorsal hippocampal lesions. *Behav Biol* 17:473-484.1976).
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28:771-784.2004).
- Dallman MF, Darlington DN, Suemaru S, Cascio CS, Levin N (Corticosteroids in homeostasis. *Acta Physiol Scand Suppl* 583:27-34.1989).
- Dantzer R, Psychoneuroendocrinology of Stress. In: *Encyclopedia of Behavioral Neurosciences* Oxford (ed. E, ed), Koob, G.F., Le Moal, M, Thompson, R.F. 2010.
- Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan JD (Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem* 14:554-563.2007).
- Davidson KM (Diagnosis of depression in alcohol dependence: changes in prevalence with drinking status. *Br J Psychiatry* 166:199-204.1995).
- Davies E, MacKenzie SM (Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:437-445.2003).
- Day JJ, Sweatt JD (Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96:2-12.2011).
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475.2005).
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422-426.1999).
- de Kloet ER, Sarabdjitsingh RA (Everything has rhythm: focus on glucocorticoid pulsatility. *Endocrinology* 149:3241-3243.2008).
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.1998).
- de Toledo-Morrell L, Morrell F, Fleming S, Cohen MM (Pentoxifylline reverses age-related deficits in spatial memory. *Behav Neural Biol* 42:1-8.1984).
- De Witte P, Pinto E, Anseau M, Verbanck P (Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neurosci Biobehav Rev* 27:189-197.2003).
- DeBellis R, Smith BS, Choi S, Malloy M (Management of delirium tremens. *J Intensive Care Med* 20:164-173.2005).
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (Prelimbic cortex specific lesions disrupt delayed-variable response tasks in the rat. *Behav Neurosci* 110:1282-1298.1996).
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behav Neurosci* 113:941-955.1999).
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behav Brain Res* 109:113-128.2000).
- Delghandi MP, Johannessen M, Moens U (The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal* 17:1343-1351.2005).
- DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER (Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:103-122.2002).
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E (Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol* 607:121-125.2009).

- Diamond DM, Fleshner M, Ingersoll N, Rose GM (Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav Neurosci* 110:661-672.1996).
- Diorio D, Viau V, Meaney MJ (The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 13:3839-3847.1993).
- Divac I (Magnocellular nuclei of the basal forebrain project to neocortex, brain stem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates. *Brain Res* 93:385-398.1975).
- Dohrman DP, Diamond I, Gordon AS (Ethanol causes translocation of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10217-10221.1996).
- Dominguez G, Faucher P, Henkous N, Krazem A, Pierard C, Beracochea D (Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone. *Front Behav Neurosci* 8:166.2014).
- Dong HW, Swanson LW, Chen L, Fanselow MS, Toga AW (Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11794-11799.2009).
- Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S (Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol* 2:1256-1264.1988).
- Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP (Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75:411-418.2003).
- Dorey R, Pierard C, Chauveau F, David V, Beracochea D (Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37:2870-2880.2012).
- Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Beracochea D (Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology* 36:2639-2649.2011).
- Douglas RJ (Cues for spontaneous alternation. *J Comp Physiol Psychol* 62:171-183.1966).
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct* 213:93-118.2008).
- Dudchenko PA (An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28:699-709.2004).
- Duffy SN, Nguyen PV (Postsynaptic application of a peptide inhibitor of cAMP-dependent protein kinase blocks expression of long-lasting synaptic potentiation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:1142-1150.2003).
- Duman CH, Duman RS (Neurobiology and treatment of anxiety: signal transduction and neural plasticity. *Handb Exp Pharmacol* 305-334.2005).
- Duman RS, Monteggia LM (A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.2006).
- Duman RS, Strada SJ, Enna SJ (Glucocorticoid administration increases receptor-mediated and forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices. *Brain Res* 477:166-171.1989).
- Duncan J, Owen AM (Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. *Trends Neurosci* 23:475-483.2000).
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D (Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53:58-68.1981).

- Dwivedi Y, Rao JS, Rizavi HS, Kotowski J, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60:273-282.2003a).
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60:804-815.2003b).
- Eckardt MJ, Martin PR (Clinical assessment of cognition in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 10:123-127.1986).
- Egger GJ (The relevance of memory, arousal, and cue factors to developmental changes in spontaneous alternation by rats. *Dev Psychobiol* 6:459-468.1973).
- Engeland WC, Arnhold MM (Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28:325-332.2005).
- Errico AL, King AC, Lovallo WR, Parsons OA (Cortisol dysregulation and cognitive impairment in abstinent male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1198-1204.2002).
- Errico AL, Parsons OA, King AC, Lovallo WR (Attenuated cortisol response to biobehavioral stressors in sober alcoholics. *J Stud Alcohol* 54:393-398.1993).
- Esel E, Sofuoglu S, Aslan SS, Kula M, Yabanoglu I, Turan MT (Plasma levels of beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol during early and late alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol* 36:572-576.2001).
- Eslinger PJ, Damasio AR (Severe disturbance of higher cognition after bilateral frontal lobe ablation: patient EVR. *Neurology* 35:1731-1741.1985).
- Eustache F, Desgranges B (MNESIS: towards the integration of current multisystem models of memory. *Neuropsychol Rev* 18:53-69.2008).
- Fahlke C, Engel JA, Eriksson CJ, Hard E, Soderpalm B (Involvement of corticosterone in the modulation of ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 11:195-202.1994).
- Fahlke C, Hansen S (Effect of local intracerebral corticosterone implants on alcohol intake in the rat. *Alcohol Alcohol* 34:851-861.1999).
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (Multiple actions of steroid hormones-- a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556.2000).
- Fama R, Pfefferbaum A, Sullivan EV (Perceptual learning in detoxified alcoholic men: contributions from explicit memory, executive function, and age. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1657-1665.2004).
- Fama R, Pfefferbaum A, Sullivan EV (Visuoperceptual learning in alcoholic Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 30:680-687.2006).
- Fanselow MS, Dong HW (Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.2010).
- Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE (Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 29:971-982.2005).
- Favre JD, Gillet C. (Devenir de patients alcoolodépendants, résultats à cinq ans et facteurs pronostiques. *Alcoologie* 19 (3 suppl) : 313-30. 1997).
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381:706-709.1996).
- Focking M, Holker I, Trapp T (Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 304:720-723.2003).
- Follenius M, Brandenberger G, Hietter B (Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 55:757-761.1982).

- Freund G, Ballinger WE (Loss of synaptic receptors can precede morphologic changes induced by alcoholism. *Alcohol Alcohol Suppl* 1:385-391.1991).
- Fuster JM (The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.2001).
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145-177.2005).
- Gabrieli JD (Disorders of memory in humans. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6:93-97.1993).
- Garcia R (Stress, metaplasticity, and antidepressants. *Curr Mol Med* 2:629-638.2002).
- Gazdzinski S, Durazzo TC, Meyerhoff DJ (Temporal dynamics and determinants of whole brain tissue volume changes during recovery from alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 78:263-273.2005).
- Gazdzinski S, Durazzo TC, Mon A, Yeh PH, Meyerhoff DJ (Cerebral white matter recovery in abstinent alcoholics--a multimodality magnetic resonance study. *Brain* 133:1043-1053.2010).
- Gazzaley A, Cooney JW, Rissman J, D'Esposito M (Top-down suppression deficit underlies working memory impairment in normal aging. *Nat Neurosci* 8:1298-1300.2005).
- Gelsi E, Vanbiervliet G, Cherikh F, Marine-Barjoan E, Truchi R, Arab K, Delmont JM, Tran A (Factors predictive of alcohol abstinence after resident detoxication among alcoholics followed in an hospital outpatient center. *Gastroenterol Clin Biol* 31:595-599.2007).
- George O, Sanders C, Freiling J, Grigoryan E, Vu S, Allen CD, Crawford E, Mandym CD, Koob GF (Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18156-18161.2012).
- Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L (Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 61:145-153.2007).
- Giralt A, Saavedra A, Carreton O, Xifro X, Alberch J, Perez-Navarro E (Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 20:4232-4247.2011).
- Glenn SW, Parsons OA, Sinha R, Stevens L (The effects of repeated withdrawals from alcohol on the memory of male and female alcoholics. *Alcohol Alcohol* 23:337-342.1988).
- Goldman-Rakic PS (Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477-485.1995).
- Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML (Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* 12:719-743.1984).
- Goldstein DB, Chin JH (Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed Proc* 40:2073-2076.1981).
- Gonzalez-Burgos G, Kroener S, Seamans JK, Lewis DA, Barrionuevo G (Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity in fast-spiking interneurons of primate dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 94:4168-4177.2005).
- Goodwin GM (Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression. *J Psychopharmacol* 11:115-122.1997).
- Gotlib IH, Joormann J (Cognition and depression: current status and future directions. *Annu Rev Clin Psychol* 6:285-312.2010).
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry* 63:353-359.2008).
- Gray TS, Carney ME, Magnuson DJ (Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology* 50:433-446.1989).

- Grossmann C, Ruhs S, Seiferth A, Gekle M (Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling. *Steroids* 75:539-543.2010a).
- Grossmann C, Wuttke M, Ruhs S, Seiferth A, Mildenerger S, Rabe S, Schwerdt G, Gekle M (Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *FASEB J* 24:2010-2019.2010b).
- Hack JB, Hoffmann RS, Nelson LS (Resistant alcohol withdrawal: does an unexpectedly large sedative requirement identify these patients early? *J Med Toxicol* 2:55-60.2006).
- Haggarty SJ, Tsai LH (Probing the role of HDACs and mechanisms of chromatin-mediated neuroplasticity. *Neurobiol Learn Mem* 96:41-52.2011).
- Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M, Kawata M (Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neurosci Res* 51:371-381.2005).
- Harris RA, Trudell JR, Mihic SJ (Ethanol's molecular targets. *Sci Signal* 1:re7.2008).
- Harvey PO, Le Bastard G, Pochon JB, Levy R, Allilaire JF, Dubois B, Fossati P (Executive functions and updating of the contents of working memory in unipolar depression. *J Psychiatr Res* 38:567-576.2004).
- Hasin DS, Tsai WY, Endicott J, Mueller TI, Coryell W, Keller M (Five-year course of major depression: effects of comorbid alcoholism. *J Affect Disord* 41:63-70.1996).
- Haubek A, Lee K (Computed tomography in alcoholic cerebellar atrophy. *Neuroradiology* 18:77-79.1979).
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:555-579.2003).
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656-670.2007).
- Henley DE, Leendertz JA, Russell GM, Wood SA, Taheri S, Woltersdorf WW, Lightman SL (Development of an automated blood sampling system for use in humans. *J Med Eng Technol* 33:199-208.2009).
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180.2003).
- Hevers W, Luddens H (The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18:35-86.1998).
- Hoehe MR, Wendel B, Grunewald I, Chiaroni P, Levy N, Morris-Rosendahl D, Macher JP, Sander T, Crocq MA (Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms are not associated with susceptibility to mood disorders. *Am J Med Genet* 81:1-3.1998).
- Hogge M, Adam S, Collette F (Directed forgetting and aging: the role of retrieval processes, processing speed, and proactive interference. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* 15:471-491.2008).
- Holsboer F (The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501.2000).
- Hu W, Zhang M, Czeh B, Flugge G, Zhang W (Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network. *Neuropsychopharmacology* 35:1693-1707.2010).
- Hurwitz TA, Clark C, Murphy E, Klonoff H, Martin WR, Pate BD (Regional cerebral glucose metabolism in major depressive disorder. *Can J Psychiatry* 35:684-688.1990).

- Imanishi T, Sawa A, Ichimaru Y, Miyashiro M, Kato S, Yamamoto T, Ueki S (Ameliorating effects of rolipram on experimentally induced impairments of learning and memory in rodents. *Eur J Pharmacol* 321:273-278.1997).
- Imbe H, Murakami S, Okamoto K, Iwai-Liao Y, Senba E (The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain* 112:361-371.2004).
- Iranmanesh A, Veldhuis JD, Johnson ML, Lizarralde G (24-hour pulsatile and circadian patterns of cortisol secretion in alcoholic men. *J Androl* 10:54-63.1989).
- Ito H, Kawashima R, Awata S, Ono S, Sato K, Goto R, Koyama M, Sato M, Fukuda H (Hypoperfusion in the limbic system and prefrontal cortex in depression: SPECT with anatomic standardization technique. *J Nucl Med* 37:410-414.1996).
- Izaki Y, Takita M, Akema T (Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. *Eur J Neurosci* 27:3029-3034.2008).
- Izquierdo I, Medina JH (Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res* 26:573-589.1993).
- Jacobson L, Sapolsky R (The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118-134.1991).
- Jacquot C, Croft AP, Prendergast MA, Mulholland P, Shaw SG, Little HJ (Effects of the glucocorticoid antagonist, mifepristone, on the consequences of withdrawal from long term alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 32:2107-2116.2008).
- Jaffard R, Les systèmes de mémoire. Les mémoires Journées internationales sur les sciences cognitives. 1994.
- Jaffe, J.H (Drug addiction and drug abuse. In: Gilman, A.G., Rail, T.W., Nies, AS.. Taylor. P. (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. USA, Pergamon Press. 522 573 p., 1990).
- James W. Principles of psychology. New York, Holt 1890.
- Janknecht R, Nordheim A (Regulation of the c-fos promoter by the ternary complex factor Sap-1a and its coactivator CBP. *Oncogene* 12:1961-1969.1996).
- Jankord R, Herman JP (Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148:64-73.2008).
- Jay TM, Witter MP (Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574-586.1991).
- Joels M (Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends Pharmacol Sci* 27:244-250.2006).
- Joels M, Baram TZ (The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466.2009).
- Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31:1-7.2008).
- Joyce EM, Robbins TW (Frontal lobe function in Korsakoff and non-Korsakoff alcoholics: planning and spatial working memory. *Neuropsychologia* 29:709-723.1991).
- Jung ME, Metzger DB (Alcohol withdrawal and brain injuries: beyond classical mechanisms. *Molecules* 15:4984-5011.2010).
- Kalueff AV, Tuohimaa P (Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res* 1028:75-82.2004a).
- Kalueff AV, Tuohimaa P (Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:151-158.2004b).
- Kametani H (Analysis of age-related changes in stress-induced grooming in the rat. Differential behavioral profile of adaptation to stress. *Ann N Y Acad Sci* 525:101-113.1988).
- Kang HJ, Schuman EM (Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Physiol Paris* 89:11-22.1995).

- Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R (Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136:29-37.2005).
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joels M (Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19204-19207.2005).
- Keedwell PA, Poon L, Papadopoulos AS, Marshall EJ, Checkley SA (Salivary cortisol measurements during a medically assisted alcohol withdrawal. *Addict Biol* 6:247-256.2001).
- Kerner B, Rao AR, Christensen B, Dandekar S, Yourshaw M, Nelson SF (Rare Genomic Variants Link Bipolar Disorder with Anxiety Disorders to CREB-Regulated Intracellular Signaling Pathways. *Front Psychiatry* 4:154.2013).
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS (The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289:3095-3105.2003).
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:593-602.2005).
- King A, Munisamy G, de Wit H, Lin S (Attenuated cortisol response to alcohol in heavy social drinkers. *Int J Psychophysiol* 59:203-209.2006).
- Kliethermes CL (Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28:837-850.2005).
- Knapp DJ, Overstreet DH, Breese GR (Modulation of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior during later withdrawals by treatment of early withdrawals with benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid ligands. *Alcohol Clin Exp Res* 29:553-563.2005).
- Koch JM, Kell S, Hinze-Selch D, Aldenhoff JB (Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression. *J Psychiatr Res* 36:369-375.2002).
- Koenig HN, Olive MF (The glucocorticoid receptor antagonist mifepristone reduces ethanol intake in rats under limited access conditions. *Psychoneuroendocrinology* 29:999-1003.2004).
- Koob GF (Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 27:232-243.2003).
- Koob GF, Le Moal M (Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.2001).
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flugge G, Korte SM, Meerlo P, Murison R, Olivier B, Palanza P, Richter-Levin G, Sgoifo A, Steimer T, Stiedl O, van Dijk G, Wohr M, Fuchs E (Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1291-1301.2011).
- Koolhaas JM, De Boer SF, De Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:69-72.1997).
- Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H (The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 79:983-998.1997).
- Krishnan KR, McDonald WM, Escalona PR, Doraiswamy PM, Na C, Husain MM, Figiel GS, Boyko OB, Ellinwood EH, Nemeroff CB (Magnetic resonance imaging of the caudate nuclei in depression. Preliminary observations. *Arch Gen Psychiatry* 49:553-557.1992).
- Kumar A, Newberg A, Alavi A, Berlin J, Smith R, Reivich M (Regional cerebral glucose metabolism in late-life depression and Alzheimer disease: a preliminary positron emission tomography study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7019-7023.1993).
- Kumar S, Ren Q, Beckley JH, O'Buckley TK, Gigante ED, Santerre JL, Werner DF, Morrow AL (Ethanol Activation of Protein Kinase A Regulates GABA(A) Receptor Subunit Expression in the Cerebral Cortex and Contributes to Ethanol-Induced Hypnosis. *Front Neurosci* 6:44.2012).

- Kunugi H, Tatsumi M, Sakai T, Hattori M, Nanko S (Serotonin transporter gene polymorphism and affective disorder. *Lancet* 347:1340.1996).
- Kyrou I, Tsigos C (Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 9:787-793.2009).
- Lai CC, Kuo TI, Lin HH (The role of protein kinase A in acute ethanol-induced neurobehavioral actions in rats. *Anesth Analg* 105:89-96.2007).
- Lai T, Payne ME, Byrum CE, Steffens DC, Krishnan KR (Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry* 48:971-975.2000).
- Lal H, Prather PL, Rezazadeh SM (Potential role of 5HT1C and/or 5HT2 receptors in the mianserin-induced prevention of anxiogenic behaviors occurring during ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 17:411-417.1993).
- Lalonde R (The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26:91-104.2002).
- Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P (Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:787-793.2000).
- Laroche S, Davis S, Jay TM (Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10:438-446, 2000).
- Laroche S, Davis S, Jay TM (Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10:438-446.2000).
- Laroche S, Jay TM, Thierry AM (Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neurosci Lett* 114:184-190.1990).
- Laviv T, Riven I, Dolev I, Vertkin I, Balana B, Slesinger PA, Slutsky I (Basal GABA regulates GABA(B)R conformation and release probability at single hippocampal synapses. *Neuron* 67:253-267.2010).
- Leber WR, Jenkins RL, Parsons OA (Recovery of visual-spatial learning and memory in chronic alcoholics. *J Clin Psychol* 37:192-197.1981).
- Lee S, Selvage D, Hansen K, Rivier C (Site of action of acute alcohol administration in stimulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis: comparison between the effect of systemic and intracerebroventricular injection of this drug on pituitary and hypothalamic responses. *Endocrinology* 145:4470-4479.2004).
- Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ (Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. *Neuroreport* 20:1554-1558.2009).
- Lehner M, Wislowska-Stanek A, Skorzevska A, Maciejak P, Szyndler J, Turzynska D, Sobolewska A, Plaznik A (Differences in the density of GABA-A receptor alpha-2 subunits and gephyrin in brain structures of rats selected for low and high anxiety in basal and fear-stimulated conditions, in a model of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 94:499-508.2010).
- Lescaudron L, Jaffard R, Verna A (Modifications in number and morphology of dendritic spines resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal: a Golgi study in the mouse anterior and posterior hippocampus. *Exp Neurol* 106:156-163.1989).
- Lescaudron L, Seguela P, Geffard M, Verna A (Effects of long-term ethanol consumption on GABAergic neurons in the mouse hippocampus: a quantitative immunocytochemical study. *Drug Alcohol Depend* 18:377-384.1986).
- Lescaudron L, Verna A (Effects of chronic ethanol consumption on pyramidal neurons of the mouse dorsal and ventral hippocampus: a quantitative histological analysis. *Exp Brain Res* 58:362-367.1985).

- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274:1527-1531.1996).
- Li YF, Huang Y, Amsdell SL, Xiao L, O'Donnell JM, Zhang HT (Antidepressant- and anxiolytic-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram on behavior depend on cyclic AMP response element binding protein-mediated neurogenesis in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34:2404-2419.2009).
- Lightman SL, Conway-Campbell BL (The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11:710-718.2010).
- Lishman WA, Jacobson RR, Acker C (Brain damage in alcoholism: current concepts. *Acta Med Scand Suppl* 717:5-17.1987).
- Lister R. G. (The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse). *Psychopharmacology* 92, 180-185. 1987.
- Little HJ, Croft AP, O'Callaghan MJ, Brooks SP, Wang G, Shaw SG (Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol. *Neuroscience* 156:1017-1027.2008).
- Liu D, Zhang Q, Gu J, Wang X, Xie K, Xian X, Wang J, Jiang H, Wang Z (Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 49:21-29.2014).
- Liu P, Bilkey DK (Direct connection between perirhinal cortex and hippocampus is a major constituent of the lateral perforant path. *Hippocampus* 6:125-135.1996).
- Lonergan E, Luxenberg J, Areosa Sastre A, Wyller TB (Benzodiazepines for delirium. *Cochrane Database Syst Rev* CD006379.2009).
- Lovallo WR, Dickensheets SL, Myers DA, Thomas TL, Nixon SJ (Blunted stress cortisol response in abstinent alcoholic and polysubstance-abusing men. *Alcohol Clin Exp Res* 24:651-658.2000).
- Lu A, Steiner MA, Whittle N, Vogl AM, Walser SM, Ableitner M, Refojo D, Ekker M, Rubenstein JL, Stalla GK, Singewald N, Holsboer F, Wotjak CT, Wurst W, Deussing JM (Conditional CRH overexpressing mice: an animal model for stress-elicited pathologies and treatments that target the central CRH system. *Mol Psychiatry* 13:989.2008).
- Lu NZ, Cidlowski JA (Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16:301-307.2006).
- Luethi M, Meier B, Sandi C (Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men. *Front Behav Neurosci* 2:5.2008).
- Lukoyanov NV, Madeira MD, Paula-Barbosa MM (Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. *Physiol Behav* 66:337-346.1999).
- Lupien SJ, Gillin CJ, Hauger RL (Working memory is more sensitive than declarative memory to the acute effects of corticosteroids: a dose-response study in humans. *Behav Neurosci* 113:420-430.1999).
- Lupien SJ, McEwen BS (The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* 24:1-27.1997).
- Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci* 16:3534-3540.1996).
- Majumdar SK, Shaw GK, Bridges PK (Relationship between plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol concentrations in chronic alcoholic patients with depression. *Drug Alcohol Depend* 23:111-116.1989).
- Makara GB, Stark E (Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) and GABA antagonist drugs on ACTH release. *Neuroendocrinology* 16:178-190.1974).

- Malleret G, Alarcon JM, Martel G, Takizawa S, Vronskaya S, Yin D, Chen IZ, Kandel ER, Shumyatsky GP (Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J Neurosci* 30:3813-3825.2010).
- Malminen O, Korpi ER (GABA/benzodiazepine receptor/chloride ionophore complex in brains of rat lines selectively bred for differences in ethanol-induced motor impairment. *Alcohol* 5:239-249.1988).
- Marinkovic K, Oscar-Berman M, Urban T, O'Reilly CE, Howard JA, Sawyer K, Harris GJ (Alcoholism and dampened temporal limbic activation to emotional faces. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1880-1892.2009).
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.2004).
- Martinot JL, Hardy P, Feline A, Huret JD, Mazoyer B, Attar-Levy D, Pappata S, Syrota A (Left prefrontal glucose hypometabolism in the depressed state: a confirmation. *Am J Psychiatry* 147:1313-1317.1990).
- Mathews A, MacLeod C (Cognitive vulnerability to emotional disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 1:167-195.2005).
- Mathews DB, Morrow AL (Effects of acute and chronic ethanol exposure on spatial cognitive processing and hippocampal function in the rat. *Hippocampus* 10:122-130.2000).
- McEwen BS (Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48:721-731.2000).
- McEwen BS (Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873-904.2007).
- McEwen BS, Morrison JH (The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79:16-29.2013).
- McGaugh JL, Roozendaal B (Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12:205-210.2002).
- Meliska CJ, Bartke A, McGlacken G, Jensen RA (Ethanol, nicotine, amphetamine, and aspartame consumption and preferences in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 50:619-626.1995).
- Meller E, Shen C, Nikolao TA, Jensen C, Tsimberg Y, Chen J, Gruen RJ (Region-specific effects of acute and repeated restraint stress on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases. *Brain Res* 979:57-64.2003).
- Mendel CM (The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10:232-274.1989).
- Mendelson JH, Stein S (The definition of alcoholism. *Int Psychiatry Clin* 3:3-16.1966).
- Menon V (Large-scale brain networks and psychopathology: a unifying triple network model. *Trends Cogn Sci* 15:483-506.2011).
- Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H (Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci* 24:1478-1485.2004).
- Miller EK (The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat Rev Neurosci* 1:59-65.2000).
- Miller EK, Cohen JD (An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167-202.2001).
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.1998).
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175:43-50.2006).

- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150:251-259.2007).
- Minni AM, Dorey R, Pierard C, Dominguez G, Helbling JC, Foury A, Beracochea D, Moisan MP (Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval. *Endocrinology* 153:4766-4774.2012).
- Minor TR, Jackson RL, Maier SF (Effects of task-irrelevant cues and reinforcement delay on choice-escape learning following inescapable shock: evidence for a deficit in selective attention. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 10:543-556.1984).
- Misra K, Pandey SC (Differences in basal levels of CREB and NPY in nucleus accumbens regions between C57BL/6 and DBA/2 mice differing in inborn alcohol drinking behavior. *J Neurosci Res* 74:967-975.2003).
- Misra K, Pandey SC (The decreased cyclic-AMP dependent-protein kinase A function in the nucleus accumbens: a role in alcohol drinking but not in anxiety-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 31:1406-1419.2006).
- Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H, Caron MG, Tonegawa S (Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8987-8992.2003).
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T (Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci* 20:1568-1574.2000).
- Mizuo K, Katada R, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H (Epigenetic regulation of MIR-124 under ethanol dependence and withdrawal. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 47:155-163.2012).
- Moghaddam B (Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650-1657.1993).
- Mohler H, Luscher B, Fritschy JM, Benke D, Benson J, Rudolph U (GABA(A)-receptor assembly in vivo: lessons from subunit mutant mice. *Life Sci* 62:1611-1615.1998).
- Moisan MP, Minni AM, Dominguez G, Helbling JC, Foury A, Henkous N, Dorey R, Beracochea D (Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids* 81:109-115.2014).
- Moisan MP, Seckl JR, Edwards CR (11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology* 127:1450-1455.1990).
- Monnig MA, Tonigan JS, Yeo RA, Thoma RJ, McCrady BS (White matter volume in alcohol use disorders: a meta-analysis. *Addict Biol* 18:581-592.2013).
- Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67:73-88.2010).
- Morrow AL, Ferrani-Kile K, Davis MI, Shumilla JA, Kumar S, Maldve R, Pandey SC (Ethanol effects on cell signaling mechanisms. *Alcohol Clin Exp Res* 28:217-227.2004).
- Morrow BA, Roth RH, Elsworth JD (TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. *Brain Res Bull* 52:519-523.2000).
- Moselhy HF, Georgiou G, Kahn A (Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol Alcohol* 36:357-368.2001).
- Moser MB, Moser EI (Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.1998).

- Munro CA, Oswald LM, Weerts EM, McCaul ME, Wand GS (Hormone responses to social stress in abstinent alcohol-dependent subjects and social drinkers with no history of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1133-1138.2005).
- Muzyk AJ, Leung JG, Nelson S, Embury ER, Jones SR (The role of diazepam loading for the treatment of alcohol withdrawal syndrome in hospitalized patients. *Am J Addict* 22:113-118.2013).
- Nader K, Hardt O (A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-234.2009).
- Nagy J, Muller F, Laszlo L (Cytotoxic effect of alcohol-withdrawal on primary cultures of cortical neurones. *Drug Alcohol Depend* 61:155-162.2001).
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S (NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5:361-372.2004).
- Nalpas S B, Combescure C, Pierre B, Ledent T, Gillet C, Playoust D, Danel T, Bozonnat MC, Martin S, Balmes JL, Daures JP (Devenir des patients après sevrage d'alcool. *Alcoologie et Addictologie*; 24 : 337-44, 2002).
- Nava F, Premi S, Manzato E, Campagnola W, Lucchini A, Gessa GL (Gamma-hydroxybutyrate reduces both withdrawal syndrome and hypercortisolism in severe abstinent alcoholics: an open study vs. diazepam. *Am J Drug Alcohol Abuse* 33:379-392.2007).
- Nemeroff CB (The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry* 1:336-342.1996).
- Nestler EJ (Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.2001).
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.2002).
- Neumann ID, Wegener G, Homberg JR, Cohen H, Slattery DA, Zohar J, Olivier JD, Mathe AA (Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1357-1375.2011).
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-7547.1995).
- Nicholls RE, Alarcon JM, Malleret G, Carroll RC, Grody M, Vronskaya S, Kandel ER (Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron* 58:104-117.2008).
- Nixon SJ, Parsons OA (Alcohol-related efficiency deficits using an ecologically valid test. *Alcohol Clin Exp Res* 15:601-606.1991).
- Nixon SJ, Tivis R, Parsons OA (Behavioral dysfunction and cognitive efficiency in male and female alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:577-581.1995).
- Nollet M, Gaillard P, Tanti A, Girault V, Belzung C, Leman S (Neurogenesis-independent antidepressant-like effects on behavior and stress axis response of a dual orexin receptor antagonist in a rodent model of depression. *Neuropsychopharmacology* 37:2210-2221.2012).
- Nollet M, Le Guisquet AM, Belzung C (Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 5:Unit 5* 65.2013).
- O'Daly OG, Trick L, Scaife J, Marshall J, Ball D, Phillips ML, Williams SS, Stephens DN, Duka T (Withdrawal-associated increases and decreases in functional neural connectivity associated with altered emotional regulation in alcoholism. *Neuropsychopharmacology* 37:2267-2276.2012).
- Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM, Smith CA (Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 347:731-733.1996).

- Oitzl MS, Fluttert M, de Kloet ER (The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *Eur J Neurosci* 6:1072-1079.1994).
- Okret S, Poellinger L, Dong Y, Gustafsson JA (Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5899-5903.1986).
- Olijslagers JE, de Kloet ER, Elgersma Y, van Woerden GM, Joels M, Karst H (Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. *Eur J Neurosci* 27:2542-2550.2008).
- Olton DS, Papas BC (Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669-682.1979).
- Onaivi ES, Todd S, Martin BR (Behavioral effects in the mouse during and following withdrawal from ethanol ingestion and/or nicotine administration. *Drug Alcohol Depend* 24:205-211.1989).
- Ongur D, Drevets WC, Price JL (Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13290-13295.1998).
- Oscar-Berman, M., and Hunter, N. (Frontal lobe changes after chronic alcohol ingestion. In: Hunt, W.A., and Nixon, S.J., Eds. *Alcohol-Induced Brain Damage*, NIAAA Research Monographs No. 22. Rockville, MD: National Institutes of Health, 121–156 p., 1993).
- Owen A (Working memory in dorsolateral frontal cortex. *Trends Cogn Sci* 2:239.1998).
- Owens MJ, Nemeroff CB (Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* 40:288-295.1994).
- Palumbo ML, Canzobre MC, Pascuan CG, Rios H, Wald M, Genaro AM (Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57Bl/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *J Neuroimmunol* 218:12-20.2010).
- Pandey SC (Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. *Trends Pharmacol Sci* 24:456-460.2003).
- Pandey SC (The gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein: role in positive and negative affective states of alcohol addiction. *Pharmacol Ther* 104:47-58.2004).
- Pandey SC, Mittal N, Lumeng L, Li TK (Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein gene transcription factor in genetic preference for alcohol drinking behavior. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1425-1434.1999a).
- Pandey SC, Roy A, Mittal N (Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the creb gene transcription factor in rat cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 296:857-868.2001).
- Pandey SC, Roy A, Zhang H (The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 27:396-409.2003).
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737.2008).
- Pandey SC, Zhang D, Mittal N, Nayyar D (Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. *J Pharmacol Exp Ther* 288:866-878.1999b).
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T (Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest* 115:2762-2773.2005).

- Pardon MC, Rattray I (What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? *Neurosci Biobehav Rev* 32:1103-1120.2008).
- Pariante CM, Lightman SL (The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464-468.2008).
- Pariante CM, Miller AH (Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49:391-404.2001).
- Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM (Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 43:60-66.2003).
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Guerri C (Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* 62:2309-2319.2012).
- Parsons, O. A., Butters, N., et Nathan, P. E. *Neuropsychology of alcoholism: Implications for diagnosis and treatment*. New York: Guilford Press, 1987.
- Parsons, O (Impaired neuropsychological cognitive functioning in sober alcoholics. In: Hunt W.A., and Nixon, S.J., Eds. *Alcohol Induced Brain Damage: NIAAA Research Monograph No. 22*. Rockville, MD: National Institutes of Health, pp. 173–194p. 1993).
- Patel PD, Sherman TG, Goldman DJ, Watson SJ (Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus. *Mol Endocrinol* 3:1877-1885.1989).
- Patil CG, Lad SP, Katznelson L, Laws ER, Jr. (Brain atrophy and cognitive deficits in Cushing's disease. *Neurosurg Focus* 23:E11.2007).
- Peixoto L, Abel T (The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* 38:62-76.2013).
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328:753-756.2010).
- Pelosi L, Slade T, Blumhardt LD, Sharma VK (Working memory dysfunction in major depression: an event-related potential study. *Clin Neurophysiol* 111:1531-1543.2000).
- Pentney RJ (Quantitative analysis of ethanol effects on Purkinje cell dendritic tree. *Brain Res* 249:397-401.1982).
- Pfefferbaum A, Desmond JE, Galloway C, Menon V, Glover GH, Sullivan EV (Reorganization of frontal systems used by alcoholics for spatial working memory: an fMRI study. *Neuroimage* 14:7-20.2001).
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB (Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci* 24:547-553.2004).
- Phillips SC, Cragg BG (Chronic consumption of alcohol by adult mice: effect on hippocampal cells and synapses. *Exp Neurol* 80:218-226.1983).
- Piazza PV, Le Moal M (Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 25:359-372.1997).
- Piazza PV, Le Moal M (The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19:67-74.1998).
- Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A (Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 403:229-260.1999).
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815-850.2000).

- Pitel AL, Beaunieux H, Witkowski T, Vabret F, Guillery-Girard B, Quinette P, Desgranges B, Eustache F (Genuine episodic memory deficits and executive dysfunctions in alcoholic subjects early in abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1169-1178.2007).
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391.2000).
- Pittenger C, Duman RS (Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.2008).
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32:1884-1897.2012).
- Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behav Brain Res* 155:135-146.2004).
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, Lu B (Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19:4972-4983.1999).
- Prather PL, Rezazadeh SM, Lal H (Mianserin in the treatment of ethanol withdrawal in the rat: prevention of behaviors indicative of anxiety. *Psychopharmacol Bull* 27:285-289.1991).
- Preston GC, Ward CE, Broks P, Traub M, Stahl SM (Effects of lorazepam on memory, attention and sedation in man: antagonism by Ro 15-1788. *Psychopharmacology (Berl)* 97:222-227.1989).
- Punch LJ, Self DW, Nestler EJ, Taylor JR (Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. *J Neurosci* 17:8520-8527.1997).
- Qi X, Lin W, Li J, Li H, Wang W, Wang D, Sun M (Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. *Neurobiol Dis* 31:278-285.2008).
- Qian X, Droste SK, Gutierrez-Mecinas M, Collins A, Kersante F, Reul JM, Linthorst AC (A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress. *Endocrinology* 152:3738-3748.2011).
- Qiang M, Denny A, Lieu M, Carreon S, Li J (Histone H3K9 modifications are a local chromatin event involved in ethanol-induced neuroadaptation of the NR2B gene. *Epigenetics* 6:1095-1104.2011).
- Qiu J, Wang P, Jing Q, Zhang W, Li X, Zhong Y, Sun G, Pei G, Chen Y (Rapid activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287:1017-1024.2001).
- Quinette P, Guillery-Girard B, Noel A, de la Sayette V, Viader F, Desgranges B, Eustache F (The relationship between working memory and episodic memory disorders in transient global amnesia. *Neuropsychologia* 44:2508-2519.2006).
- Raison CL, Miller AH (When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 160:1554-1565.2003).
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ (Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6:219-233.2007).
- Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS, Arnsten AF (Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron* 40:835-845.2003).
- Rasmussen DD, Mitton DR, Green J, Puchalski S (Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 25:999-1005.2001).

- Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF (Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* 605:25-32.1993).
- Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, Goodwin FK (Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *JAMA* 264:2511-2518.1990).
- Reneerkens OA, Rutten K, Steinbusch HW, Blokland A, Prickaerts J (Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berl)* 202:419-443.2009).
- Reynolds JN, Prasad A, MacDonald JF (Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur J Pharmacol* 224:173-181.1992).
- Rich JB, Brown GG (Selective dissociations of sedation and amnesia following ingestion of diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 106:346-350.1992).
- Richardson HN, Lee SY, O'Dell LE, Koob GF, Rivier CL (Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *Eur J Neurosci* 28:1641-1653.2008).
- Riege WH, Holloway JA, Kaplan DW (Specific memory deficits associated with prolonged alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 5:378-385.1981).
- Riley JN, Walker DW (Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science* 201:646-648.1978).
- Riniker B, Sieber P, Rittel W, Zuber H (Revised amino-acid sequences for porcine and human adrenocorticotrophic hormone. *Nat New Biol* 235:114-115.1972).
- Ritson B, Chick J (Comparison of two benzodiazepines in the treatment of alcohol withdrawal: effects on symptoms and cognitive recovery. *Drug Alcohol Depend* 18:329-334.1986).
- Rivest S, Rivier C (Lesions of hypothalamic PVN partially attenuate stimulatory action of alcohol on ACTH secretion in rats. *Am J Physiol* 266:R553-558.1994).
- Rivier C, Bruhn T, Vale W (Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *J Pharmacol Exp Ther* 229:127-131.1984).
- Roberts AJ, Crabbe JC, Keith LD (Genetic differences in hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to acute ethanol and acute ethanol withdrawal. *Brain Res* 579:296-302.1992).
- Robertson DA, Beattie JE, Reid IC, Balfour DJ (Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress. *Eur J Neurosci* 21:1511-1520.2005).
- Rondepierre JJ, Jolivet B, Boegner-Plichet M ([Diazepam: A New Anxiolytic Agent]. *Presse Med* 72:1061-1062.1964).
- Roosendaal B, McReynolds JR, McGaugh JL (The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. *J Neurosci* 24:1385-1392.2004).
- Roosendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* 15:553-560.2002).
- Rose EJ, Ebmeier KP (Pattern of impaired working memory during major depression. *J Affect Disord* 90:149-161.2006).
- Rosewicz S, McDonald AR, Maddux BA, Goldfine ID, Miesfeld RL, Logsdon CD (Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J Biol Chem* 263:2581-2584.1988).

- Roy A, Mittal N, Zhang H, Pandey SC (Modulation of cellular expression of glucocorticoid receptor and glucocorticoid response element-DNA binding in rat brain during alcohol drinking and withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 301:774-784.2002).
- Runyan JD, Dash PK (Distinct prefrontal molecular mechanisms for information storage lasting seconds versus minutes. *Learn Mem* 12:232-238.2005).
- Rush B. *An inquiry into the effects of ardent spirits upon the human body and mind: with an account of the means of preventing, and of the remedies for curing them.* Philadelphia: Tract Association of Friends, 1808.
- Rusted JM, Eaton-Williams P, Warburton DM (A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on working memory. *Psychopharmacology (Berl)* 105:442-445.1991).
- Sakai RR, Lakshmi V, Monder C, McEwen BS (Immunocytochemical localization of 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in hippocampus and other brain regions of the rat. *J Neuroendocrinol* 4:101-106.1992).
- Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Shi G, Pandey SC (Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 36:61-71.2012).
- Sandi C (The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast* 6:41-52.1998).
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.2003).
- Sapolsky RM (Stress hormones: good and bad. *Neurobiol Dis* 7:540-542.2000).
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 7:284-301.1986).
- Savitz J, Drevets WC (Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci Biobehav Rev* 33:699-771.2009).
- Schachter S. Cognition and peripheralist-centralist controversies in motivation and emotion. In M.S. Gazzaniga and C. blakemore (eds.), *Handbook of psychobiology.* New York, Academic Press,1975.
- Schacher S, Castellucci VF, Kandel ER (cAMP evokes long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons that requires new protein synthesis. *Science* 240:1667-1669.1988).
- Schuckit MA, Hesselbrock V (Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? *Am J Psychiatry* 151:1723-1734.1994).
- Schuckit MA, Tipp JE, Bergman M, Reich W, Hesselbrock VM, Smith TL (Comparison of induced and independent major depressive disorders in 2,945 alcoholics. *Am J Psychiatry* 154:948-957.1997).
- Schwabe L, Schachinger H, de Kloet ER, Oitzl MS (Corticosteroids operate as a switch between memory systems. *J Cogn Neurosci* 22:1362-1372.2010a).
- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS (Memory formation under stress: quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev* 34:584-591.2010b).
- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G (Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* 433:526-549.2001).
- Schweinsburg BC, Taylor MJ, Alhassoon OM, Videen JS, Brown GG, Patterson TL, Berger F, Grant I (Chemical pathology in brain white matter of recently detoxified alcoholics: a 1H magnetic resonance spectroscopy investigation of alcohol-associated frontal lobe injury. *Alcohol Clin Exp Res* 25:924-934.2001).

- Scoville WB, Milner B (Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.1957).
- Seckl JR (Glucocorticoids, fetoplacental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids* 62:89-94.1997).
- Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR (Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Prog Horm Res* 59:359-393.2004).
- Seckl JR, Walker BR (Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142:1371-1376.2001).
- Seeley WW, Menon V, Schatzberg AF, Keller J, Glover GH, Kenna H, Reiss AL, Greicius MD (Dissociable intrinsic connectivity networks for salience processing and executive control. *J Neurosci* 27:2349-2356.2007).
- Segal M, Richter-Levin G, Maggio N (Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus* 20:1332-1338.2010).
- Selye H. (The stress of life. New York, McGraw-Hill. 1956).
- Sheline YI (Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54:338-352.2003).
- Shen CP, Tsimberg Y, Salvatore C, Meller E (Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci* 5:36.2004).
- Shimamura AP, Jernigan TL, Squire LR (Korsakoff's syndrome: radiological (CT) findings and neuropsychological correlates. *J Neurosci* 8:4400-4410.1988).
- Shukla SD, Velazquez J, French SW, Lu SC, Ticku MK, Zakhari S (Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1525-1534.2008).
- Sibille E, Wang Y, Joeyen-Waldorf J, Gaiteri C, Surget A, Oh S, Belzung C, Tseng GC, Lewis DA (A molecular signature of depression in the amygdala. *Am J Psychiatry* 166:1011-1024.2009).
- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW (The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* 38:457-510.1982).
- Silberberg G, Grillner S, LeBeau FE, Maex R, Markram H (Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci* 28:541-551.2005).
- Simon H, Scatton B, Le Moal M (Definitive disruption of spatial delayed alternation in rats after lesions in the ventral mesencephalic tegmentum. *Neurosci Lett* 15:319-324.1979).
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15:1768-1777.1995).
- Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM (Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97:253-266.2000).
- Spanagel R (Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649-705.2009).
- Squire LR (Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.1992).
- Squire LR (Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.2004).
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* 72:25-33.2012).
- Starkman MN, Giordani B, Berent S, Schork MA, Schteingart DE (Elevated cortisol levels in Cushing's disease are associated with cognitive decrements. *Psychosom Med* 63:985-993.2001).

- Stellato C (Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* 1:255-263.2004).
- Stevens R, Cowey A (Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. *Brain Res* 52:203-224.1973).
- Stewart MG, Davies HA, Sandi C, Kraev IV, Rogachevsky VV, Peddie CJ, Rodriguez JJ, Cordero MI, Donohue HS, Gabbott PL, Popov VI (Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience* 131:43-54.2005).
- Stilling RM, Fischer A (The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96:19-26.2011).
- Stone EA, McEwen BS, Herrera AS, Carr KD (Regulation of alpha and beta components of noradrenergic cyclic AMP response in cortical slices. *Eur J Pharmacol* 141:347-356.1987).
- Sui L, Wang Y, Ju LH, Chen M (Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 97:425-440.2012).
- Sullivan EV, Mathalon DH, Zipursky RB, Kersteen-Tucker Z, Knight RT, Pfefferbaum A (Factors of the Wisconsin Card Sorting Test as measures of frontal-lobe function in schizophrenia and in chronic alcoholism. *Psychiatry Res* 46:175-199.1993).
- Sullivan EV, Rosenbloom MJ, Pfefferbaum A (Pattern of motor and cognitive deficits in detoxified alcoholic men. *Alcohol Clin Exp Res* 24:611-621.2000a).
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157:1552-1562.2000b).
- Sun P, Enslin H, Myung PS, Maurer RA (Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8:2527-2539.1994).
- Surget A, Belzung C. X (Unpredictable chronic mild stress in mice, in Kalueff AV, Laporte J. *Experimental animal models in neurobehavioral research*. New York: Nova Science Publishers, Inc, 195p., 2009).
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C (Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64:293-301.2008).
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C (Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry* 16:1177-1188.2011).
- Suri D, Vaidya VA (Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239:196-213.2013).
- Tabakoff B, Hoffman PL (Development of functional dependence on ethanol in dopaminergic systems. *J Pharmacol Exp Ther* 208:216-222.1979).
- Tabakoff B, Jafee RC, Ritzmann RF (Corticosterone concentrations in mice during ethanol drinking and withdrawal. *J Pharm Pharmacol* 30:371-374.1978).
- Tanji J, Hoshi E (Role of the lateral prefrontal cortex in executive behavioral control. *Physiol Rev* 88:37-57.2008).
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147:5549-5556.2006).
- Taylor JR, Birnbaum S, Ubriani R, Arnsten AF (Activation of cAMP-dependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. *J Neurosci* 19:RC23.1999).

- Terfehr K, Wolf OT, Schlosser N, Fernando SC, Otte C, Muhtz C, Beblo T, Driessen M, Spitzer C, Lowe B, Wingenfeld K (Hydrocortisone impairs working memory in healthy humans, but not in patients with major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 215:71-79.2011).
- Thiele TE, Willis B, Stadler J, Reynolds JG, Bernstein IL, McKnight GS (High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice. *J Neurosci* 20:RC75.2000).
- Thomas DN, Post RM, Pert A (Central and systemic corticosterone differentially affect dopamine and norepinephrine in the frontal cortex of the awake freely moving rat. *Ann N Y Acad Sci* 746:467-469.1994).
- Thomas GJ, Spafford PS (Deficits for representational memory induced by septal and cortical lesions (singly and combined) in rats. *Behav Neurosci* 98:394-404.1984).
- Torvik A, Torp S (The prevalence of alcoholic cerebellar atrophy. A morphometric and histological study of an autopsy material. *J Neurol Sci* 75:43-51.1986).
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 13:349-358.2006).
- Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343-351.2010).
- Trotter T. *An Essay, Medical, Philosophical, and Chemical, on Drunkenness and Its Effects on the Human Body* (This a facsimile of the first (1804) London edition. The book itself was based on the thesis “De ebrietate, ejusque effectibus in corpus humanum” that Trotter had presented to Edinburgh University in 1788). London: Routledge; 1988.
- Tulving E, Schacter DL, McLachlan DR, Moscovitch M (Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia. *Brain Cogn* 8:3-20.1988).
- Tulving E (Organisation of memory: quo vadis? (Gazzaniga MS, ed) *The cognitive neurosciences*. 839-847p., 1995).
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.2009).
- Uusi-Oukari M, Korpi ER (Cerebellar GABAA receptor binding and function in vitro in two rat lines developed for high and low alcohol sensitivity. *Neurochem Res* 14:733-739.1989).
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146:3-17.2003).
- Valdez GR, Roberts AJ, Chan K, Davis H, Brennan M, Zorrilla EP, Koob GF (Increased ethanol self-administration and anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1494-1501.2002).
- Van Eekelen JA, De Kloet ER (Co-localization of brain corticosteroid receptors in the rat hippocampus. *Prog Histochem Cytochem* 26:250-258.1992).
- Van Eekelen JA, Jiang W, De Kloet ER, Bohn MC (Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res* 21:88-94.1988).
- van Steensel B, van Binnendijk EP, Hornsby CD, van der Voort HT, Krozowski ZS, de Kloet ER, van Driel R (Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J Cell Sci* 109 (Pt 4):787-792.1996).
- Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, Bodard S, Kousignian I, Belzung C, Chalon S (n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *J Lipid Res* 49:340-348.2008).

- Vandesquille M, Baudonnat M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Beracochea D (Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal alpha4beta2*-nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging*.2013).
- Vargas ML, Abella C, Hernandez J (Diazepam increases the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis activity by a cyclic AMP-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 133:1355-1361.2001).
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277:376-380.1997).
- Vaz LJ, Pradella-Hallinan M, Bueno OF, Pompeia S (Acute glucocorticoid effects on the multicomponent model of working memory. *Hum Psychopharmacol* 26:477-487.2011).
- Vertes RP (Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.2004).
- Vertes RP (Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1-20.2006).
- Vertes RP, Hoover WB (Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 508:212-237.2008).
- Videbech P (PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatr Scand* 101:11-20.2000).
- Voltaire-Carlsson A, Hiltunen AJ, Koechling UM, Borg S (Effects of long-term abstinence on psychological functioning: a prospective longitudinal analysis comparing alcohol-dependent patients and healthy volunteers. *Alcohol* 13:415-421.1996).
- Walker EA, Stewart PM (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends Endocrinol Metab* 14:334-339.2003).
- Wallner M, Hanchar HJ, Olsen RW (Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15218-15223.2003).
- Walter M, Gerhard U, Gerlach M, Weijers HG, Boening J, Wiesbeck GA (Cortisol concentrations, stress-coping styles after withdrawal and long-term abstinence in alcohol dependence. *Addict Biol* 11:157-162.2006).
- Waltman C, Blevins LS, Jr., Boyd G, Wand GS (The effects of mild ethanol intoxication on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nonalcoholic men. *J Clin Endocrinol Metab* 77:518-522.1993).
- Wand G (The anxious amygdala: CREB signaling and predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest* 115:2697-2699.2005).
- Wand GS, Dobs AS (Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1290-1295.1991).
- Wang HY, Undie AS, Friedman E (Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol Pharmacol* 48:988-994.1995).
- Wang WS, Kang S, Liu WT, Li M, Liu Y, Yu C, Chen J, Chi ZQ, He L, Liu JG (Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *J Neurosci* 32:13763-13775.2012).
- Wasilewski D, Matsumoto H, Kur E, Dziklinska A, Wozny E, Stencka K, Skalski M, Chaba P, Szelenberger W (Assessment of diazepam loading dose therapy of delirium tremens. *Alcohol* 31:273-278.1996).

- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR (Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59:914-931.2008).
- Weissman MM, Myers JK (Clinical depression in alcoholism. *Am J Psychiatry* 137:372-373.1980).
- Wernicke C. *Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Aerzte und Studierende*; 1881:229–42.
- White AM, Simson PE, Best PJ (Comparison between the effects of ethanol and diazepam on spatial working memory in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 133:256-261.1997).
- Willenbring ML, Morley JE, Niewoehner CB, Heilman RO, Carlson CH, Shafer RB (Adrenocortical hyperactivity in newly admitted alcoholics: prevalence, course and associated variables. *Psychoneuroendocrinology* 9:415-422.1984).
- Williams GV, Goldman-Rakic PS (Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376:572-575.1995).
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.1987).
- Wilson J, Watson WP, Little HJ (CCK(B) antagonists protect against anxiety-related behaviour produced by ethanol withdrawal, measured using the elevated plus maze. *Psychopharmacology (Berl)* 137:120-131.1998).
- Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD (The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139:4044-4052.1998a).
- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139:443-450.1998b).
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33:161-253.1989).
- Wolf OT, Convit A, McHugh PF, Kandil E, Thorn EL, De Santi S, McEwen BS, de Leon MJ (Cortisol differentially affects memory in young and elderly men. *Behav Neurosci* 115:1002-1011.2001).
- Woods, J.H., Katz, J.L., Winger, G (Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol. Rev.* 44 (2), 151-347, 1992).
- Woolley CS, Gould E, McEwen BS (Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531:225-231.1990).
- World Health Organization (WHO), *Global status report on alcohol and health 2004*, Geneva, Switzerland, 2004.
- World Health Organization (WHO), *Global status report on alcohol and health 2004*, Geneva, Switzerland, 2004.
- Xiao L, Qi A, Chen Y (Cultured embryonic hippocampal neurons deficient in glucocorticoid (GC) receptor: a novel model for studying nongenomic effects of GC in the neural system. *Endocrinology* 146:4036-4041.2005).
- Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X (Curcumin reverses the effects of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res* 1122:56-64.2006).
- Yalcin I, Belzung C, Surget A (Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res* 193:140-143.2008).

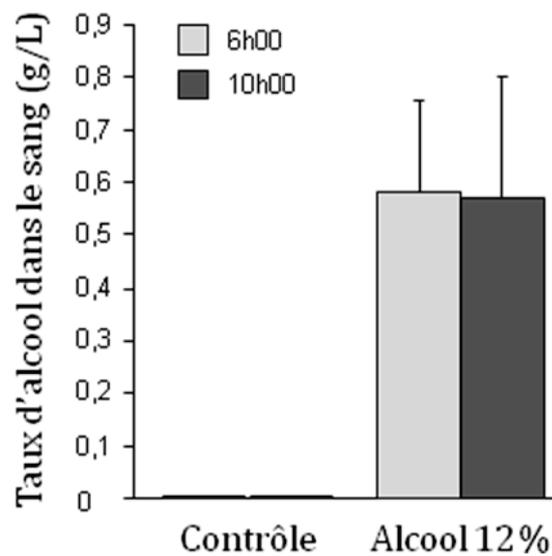
- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T (Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm* 110:671-680.2003).
- Yang X, Diehl AM, Wand GS (Ethanol exposure alters the phosphorylation of cyclic AMP responsive element binding protein and cyclic AMP responsive element binding activity in rat cerebellum. *J Pharmacol Exp Ther* 278:338-346.1996).
- Yang X, Horn K, Baraban JM, Wand GS (Chronic ethanol administration decreases phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in granule cells of rat cerebellum. *J Neurochem* 70:224-232.1998a).
- Yang X, Horn K, Wand GS (Chronic ethanol exposure impairs phosphorylation of CREB and CRE-binding activity in rat striatum. *Alcohol Clin Exp Res* 22:382-390.1998b).
- Yao L, Arolfo MP, Dohrman DP, Jiang Z, Fan P, Fuchs S, Janak PH, Gordon AS, Diamond I (betagamma Dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell* 109:733-743.2002).
- York JL, Biederman I (Hand movement speed and accuracy in detoxified alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 15:982-990.1991).
- You C, Zhang H, Sakharkar AJ, Teppen T, Pandey SC (Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:313-322.2014).
- Young EA, Abelson J, Lightman SL (Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* 25:69-76.2004).
- Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K (Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem* 114:1840-1851.2010).
- Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF (Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci* 17:8528-8535.1997).
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S (cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276:11487-11495.2001).
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW (Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* 31:17800-17810.2011).
- Zhang H, Pandey SC (Effects of PKA modulation on the expression of neuropeptide Y in rat amygdaloid structures during ethanol withdrawal. *Peptides* 24:1397-1402.2003).
- Zhang H, Sakharkar AJ, Shi G, Ugale R, Prakash A, Pandey SC (Neuropeptide Y signaling in the central nucleus of amygdala regulates alcohol-drinking and anxiety-like behaviors of alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 34:451-461.2010).
- Zhou J, Cidlowski JA (The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.2005).
- Zhu S, Shi R, Wang J, Wang JF, Li XM (Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. *Neuroreport* 25:1151-1155.2014).

Annexes

Annexe 1 : Alcoolémie

A l'aide d'un kit (Ethanol Assay kit, ECET-100), le taux d'alcool dans le sang des souris alcoolisées a été dosé pendant la période d'alcoolisation à 12 % sur 11 souris, ainsi que sur 4 souris *Contrôle*, consommant uniquement de l'eau. Pour cela, le sang a été prélevé durant la phase nocturne (6h du matin) par prélèvement sous-mandibulaire et durant la phase diurne (10h du matin). Les prélèvements ont été réalisés sur les mêmes souris à une semaine d'intervalle. Les souris demeurent en cage collective jusqu'au moment du prélèvement où les boissons alcoolisées étaient accessibles.

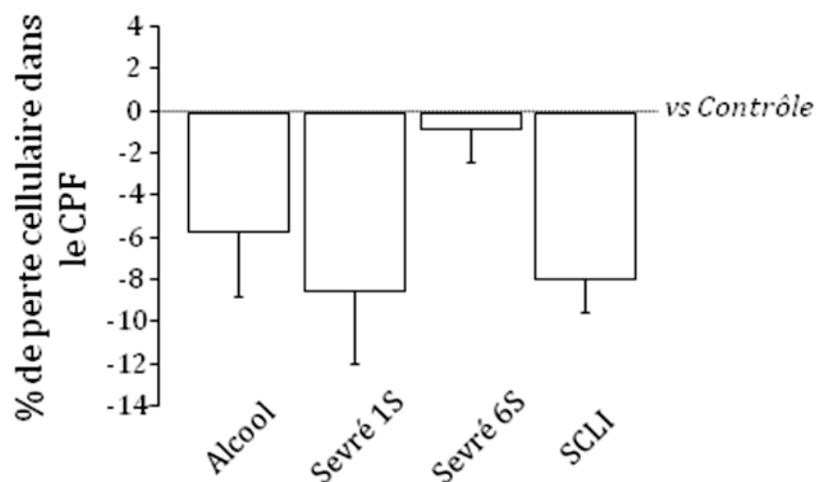
Les dosages montrent que la procédure d'alcoolisation chronique à 12% induit une alcoolémie moyenne de 0.58 ± 0.17 g/L à 6h00 et de 0.57 ± 0.23 g/L à 10h00. De plus, les dosages confirment que chez les souris *Contrôle* le taux d'alcoolémie est de 0g/L pour tous les animaux.



Annexe 2 : Quantification de la perte cellulaire

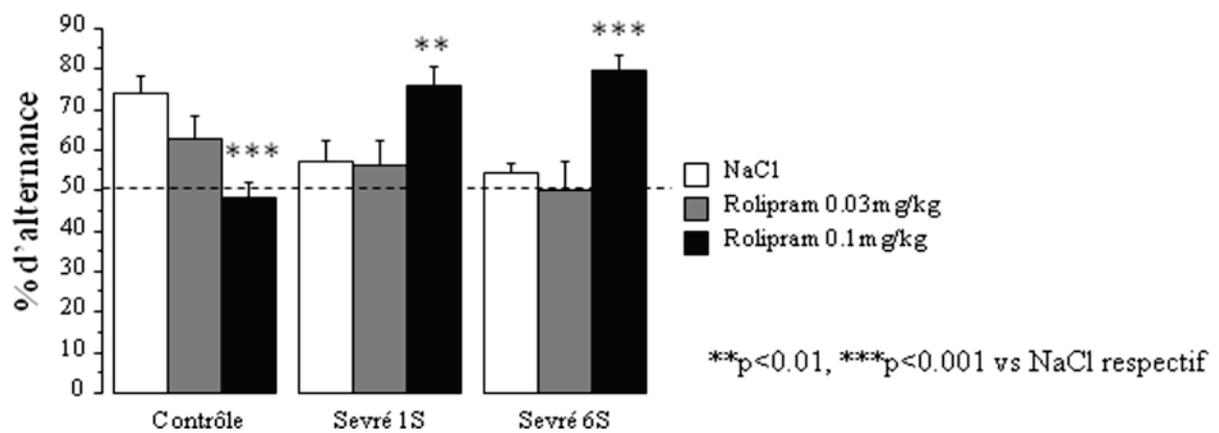
Afin de mesurer la perte cellulaire dans le CPF, induite par la procédure d'alcoolisation, le sevrage ou par le SCLI, les corps cellulaires ont été marqués à l'aide d'une coloration cytoplasmique à la thionine. Pour cela, les cerveaux des différents groupes ont été prélevés et congelés à -80°C , puis les cerveaux ont été coupés frontalement avec une épaisseur de $20\mu\text{m}$ à l'aide d'un cryostat. Le marquage à la thionine a ensuite été réalisé, puis le nombre de cellules a été quantifié à l'aide du logiciel d'analyse cellprofiler® dans le CPF.

Les analyses montrent que seul le sevrage aigu (1 semaine : $-8.52\pm 3.5\%$ vs *Contrôle*, $p=0.02$) et le SCLI ($-8.04\pm 1.6\%$ vs *Contrôle*, $p=0.026$) induisent une perte cellulaire significative. En revanche, l'alcoolisation (Groupe *Alcool*) ne diminue pas significativement le nombre de cellule dans le CPF ($-5.75\pm 3.1\%$ vs *Contrôle*). De plus, après un sevrage prolongé (6 semaines) aucune différence avec les souris *Contrôle* n'est observée ($-0.9\pm 1.6\%$ vs *Contrôle*).



Annexe 3 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de rolipram

Afin de déterminer la dose efficace pour réduire les troubles de la MDT au sein des souris *Sevré*, deux doses ont été évaluées sur la base des données préliminaires, une dose de 0.03mg/kg et une dose de 0.1mg/kg. Les injections ont été réalisées 30 minutes avant le début du test.

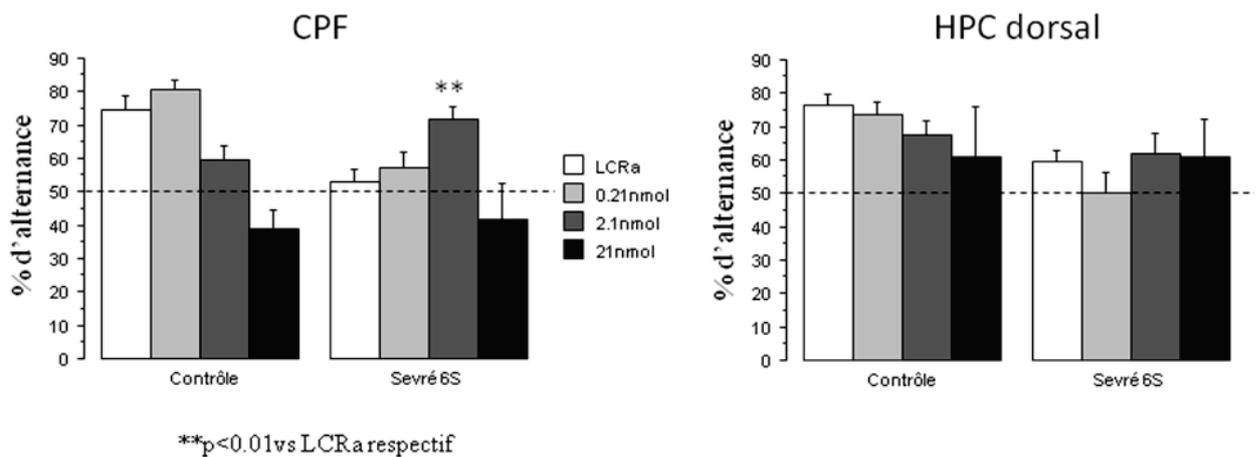


L'ANOVA montre un effet traitement significatif ($F_{(2,71)}=4.1$, $p=0.02$) ; cependant, l'analyse post-hoc atteste que la dose de 0.03mg/kg n'a pas d'effet significatif sur le taux d'alternance ($p=0.16$ vs NaCl). A l'inverse, la dose de 0.1mg/kg modifie significativement les taux d'alternances ($p=0.009$ vs NaCl).

Annexe 4 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de Sp-cAMPS

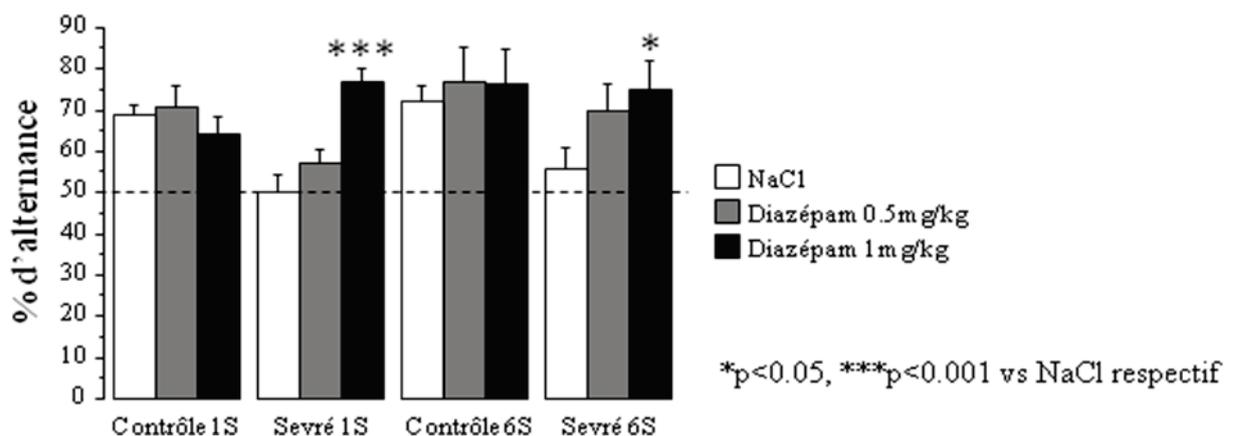
La dose efficace de Sp-cAMPS a également été déterminée à l'aide d'une expérience préliminaire. Trois doses ont été testées 0.21nmol, 2.1nmol et 21nmol sur les souris *Contrôle* et *Sevré 6S*. Les injections in situ ont été réalisées dans le CPF et l'HPC dorsal, 15 minutes avant le test d'AS.

Les analyses statistiques montrent un effet traitement significatif ($F_{(3,64)}=6.7$, $p<0.01$) au sein du CPF, mais non au sein de l'HPC dorsal ($F_{(3,66)}=0.6$, $p=0.62$). Les analyses post-hoc témoignent au sein du CPF que seul la dose de 2.1nmol améliore les performances de souris *Sevré 6S* ($p=0.002$ vs LCRa), en revanche les doses de 0.21nmol et 21nmol n'ont pas d'effet sur les taux d'alternance ($p=0.5$ et $p=0.18$ respectivement vs LCRa).



Annexe 5 : Expérience préliminaire pour définir la dose efficace de diazépam

Dans le but également de déterminer la dose efficace d'un traitement chronique au diazépam pour restaurer les performances de MDT, deux doses ont été testées comme précédemment décrit dans la section « Matériel et Méthode ». Le traitement avec la dose de 0.5mg/kg ou celle de 1mg/kg a été administré puis les animaux ont réalisé le test d'AS soit 24 heures (groupe 1S) soit 5 semaines (groupe 6S) après la dernière injection.



L'ANOVA révèle un effet significatif du traitement ($F_{(2,66)}=4.6$, $p=0.013$). Les analyses post-hoc montrent que la dose de 1mg/kg améliore les performances des souris *Sevré 1S et 6S* (*1S*: $p<0.001$ et *6S*: $p=0.047$ versus NaCl respectif). En revanche, la dose de 0.5mg/kg n'a pas d'effet significatif à long terme (*Sevré 6S*: $p=NS$ versus NaCl respectif).

Annexe 6: Poster IREB

Gaëlle DOMINGUEZ^{1,2}, Malorie DAGNAS², Nadia HENKOUS², Laurence DECORTE², Daniel BERACOCHEA² et Nicole MONS²

¹ U-930, Inserm, Université François Rabelais, 37200 Tours, France

² Institute de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence Cedex-France

→ Le sevrage à l'alcool s'accompagne d'un déficit de la mémoire de travail c'est à dire de la capacité à maintenir une information pendant une courte période de temps.

→ D'une autre part, le sevrage à l'alcool perturbe les mécanismes épigénétiques notamment l'acétylation des histones qui joue un rôle déterminant dans la formation de la mémoire.

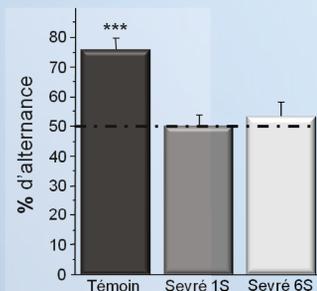


Nous étudions les effets du sevrage à l'alcool à court terme (1 semaine, 1S) et à long terme (6 semaines, 6S) après 6 mois d'alcoolisation chez la souris sur l'acétylation de l'histone H4 lors d'une tâche de mémoire de travail, l'alternance spontanée dans deux structures cérébrales : l'hippocampe dorsal et le cortex préfrontal (*expérience 1*) ainsi que l'implication de la voie moléculaire AMPc/PKA dans l'apparition des déficits de mémoire de travail liée au sevrage à l'alcool (*expérience 2*).

Etude de la mémoire de travail: épreuve d'alternance spontanée



Mesure de la mémoire de travail: test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T avec une procédure de 6 essais séparés de 90 secondes.



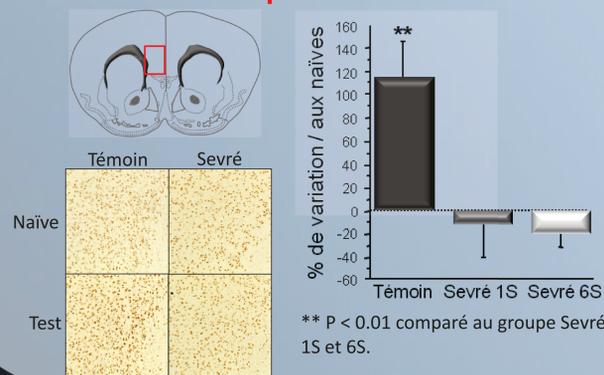
Résultat du test de mémoire de travail : pourcentage d'alternance réalisé lors des 6 essais. *** P < 0.001 comparé au groupe Sevré 1S et 6S.

→ Le sevrage à l'alcool induit un déficit de mémoire de travail et ce, quelle que soit la durée du sevrage.

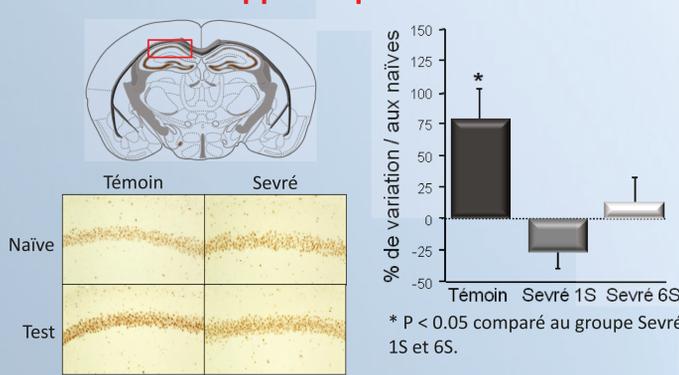
Effet du sevrage sur l'acétylation de H4 après le test de mémoire de travail

Afin d'examiner le niveau d'acétylation de l'histone H4, les souris sont sacrifiées 30 min après le début du test. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au niveau d'acétylation de souris non entraînées (Naïves).

Cortex préfrontal



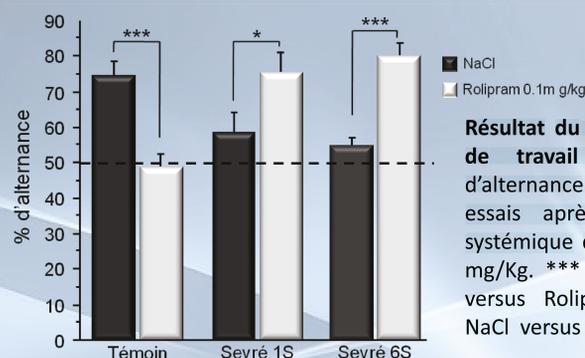
Hippocampe Dorsal



→ Le test de mémoire de travail augmente l'acétylation de H4 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe dorsal des souris Témoin.
→ Les déficits mnésiques observés chez les souris sevrées 1S et 6S sont associés à un défaut d'acétylation de H4 induit par le test dans ces deux structures.

Des travaux récents de l'équipe montrent que les déficits de mémoire de travail de souris âgées reposent sur une altération de la voie moléculaire AMPc/PKA (Vandesquille et al., 2013). Afin de pallier aux déficits de mémoire de travail associés au sevrage à l'alcool, une administration systémique de Rolipram permettant d'activer la voie moléculaire AMPc/PKA a été réalisée 30 minutes avant le début du test.

Effet du Rolipram sur la mémoire de travail

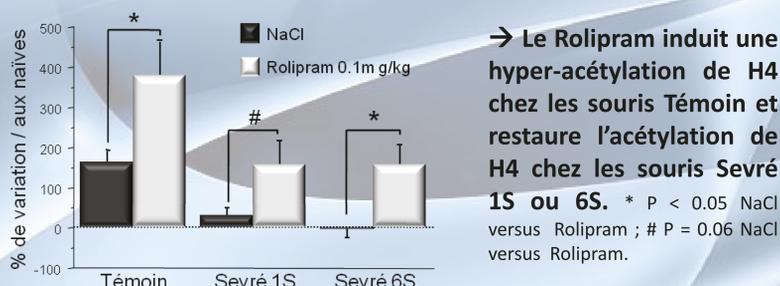


Résultat du test de mémoire de travail : Pourcentage d'alternance réalisé lors des 6 essais après une injection systémique de Rolipram à 0.1 mg/kg. *** P < 0.001 NaCl versus Rolipram ; * P < 0.05 NaCl versus Rolipram.

→ Le Rolipram induit un effet cognitif bidirectionnel chez les souris Témoin (perturbation) et Sevré 1S ou 6S (facilitation) sur la mémoire de travail.

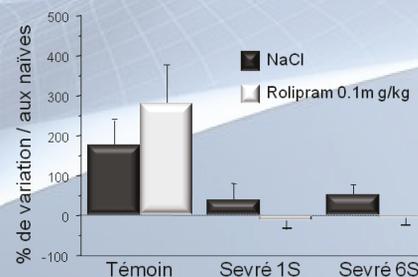
Effet du Rolipram sur l'acétylation de H4 après le test de mémoire de travail

Cortex préfrontal



→ Le Rolipram induit une hyper-acétylation de H4 chez les souris Témoin et restaure l'acétylation de H4 chez les souris Sevré 1S ou 6S. * P < 0.05 NaCl versus Rolipram ; # P = 0.06 NaCl versus Rolipram.

Hippocampe Dorsal



→ En revanche, le Rolipram ne modifie pas le niveau d'acétylation de H4 dans l'hippocampe dorsal.

Le sevrage à l'alcool induit des troubles de mémoire de travail associés à une perturbation de l'acétylation de l'histone H4 dans le cortex préfrontal et l'hippocampe dorsal. L'administration de Rolipram, en rétablissant la fonction de H4 acétylée dans le cortex préfrontal, permet de réduire ces troubles cognitifs.



Annexe 7: Poster de vulgarisation pour les Doctoriales

Etude de la régulation du stress et de la conformation de l'ADN chez la souris

Gaëlle Dominguez étudiante en thèse à l'Université de Tours; thèse sous la codirection de Catherine Belzung, Université de Tours, Inserm U-930 FRE CNRS 2448 et Daniel Beracochea, Université de Bordeaux 1, UMR CNRS 5287, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine.

Contexte

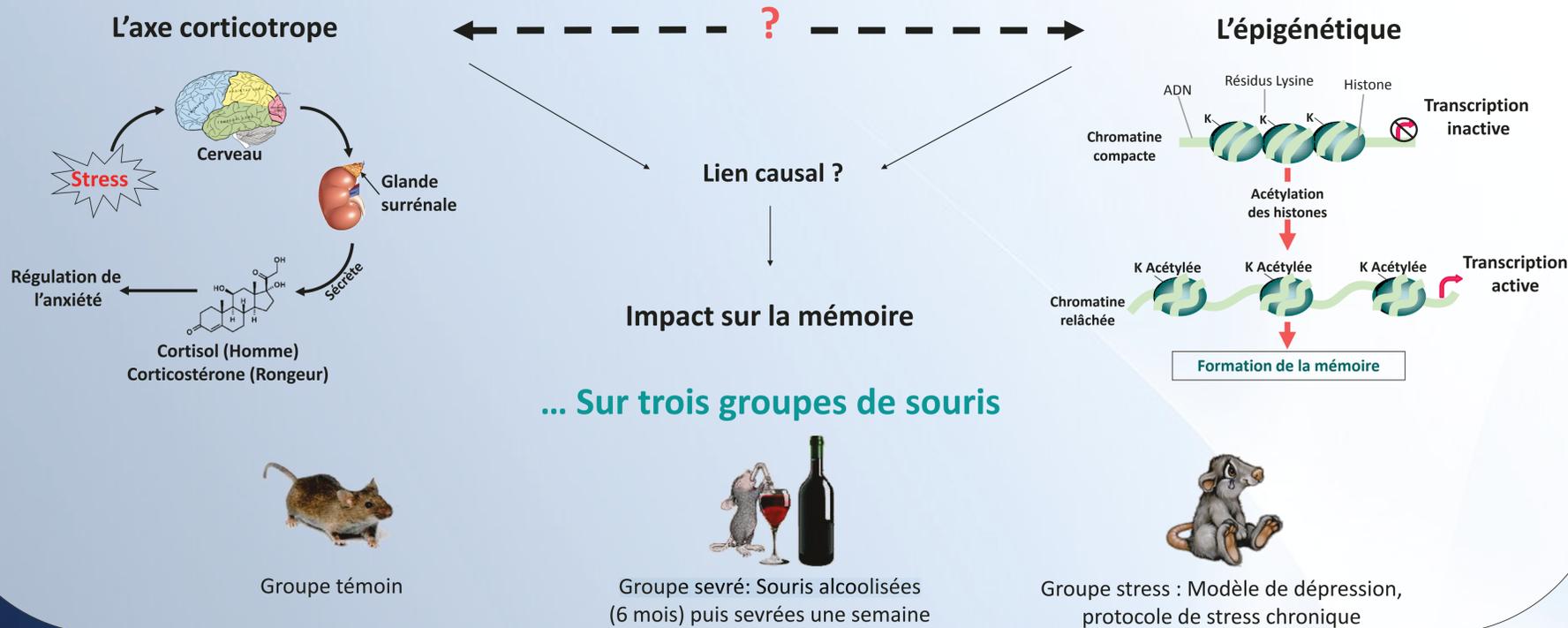
Après une phase d'alcoolisation chronique et régulière, un syndrome dépressif est observé chez 67% des personnes en début de sevrage. De plus, le sevrage provoque des déficits de mémoire, en partie liés à une perturbation de la régulation de la conformation de l'ADN (impact épigénétique de la consommation chronique d'alcool).

En parallèle, dans le cas d'une dépression associée au stress chronique, une perturbation de la régulation de l'axe corticotrope et des modifications épigénétiques sont également observées.

Objectifs

Déterminer si les modifications épigénétiques et de l'axe corticotrope induites par le sevrage à l'alcool ou par la dépression associée au stress chronique sont comparables ou non.

Deux axes d'étude...



... Sur trois groupes de souris



Groupe témoin



Groupe sevré: Souris alcoolisées (6 mois) puis sevrées une semaine



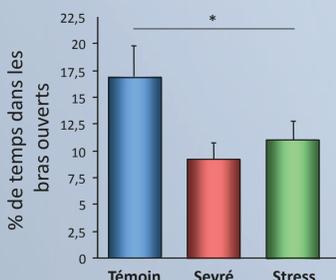
Groupe stress : Modèle de dépression, protocole de stress chronique

Méthodologie et Résultats

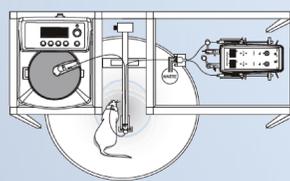
Comment mesurer l'anxiété ?



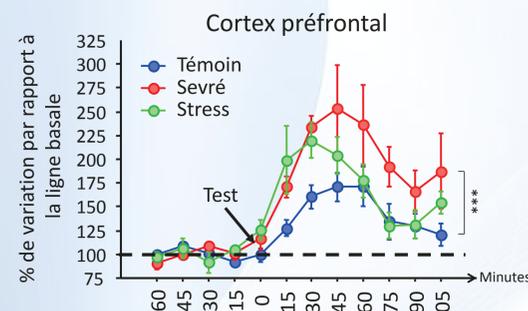
Labyrinthe en croix surélevé



Mesure comportementale: le temps passé dans les bras ouverts (situation stressante) donne un indice du niveau d'anxiété. **Les souris sevrées et stressées sont plus anxieuses que les souris témoins.**



Système de microdialyse



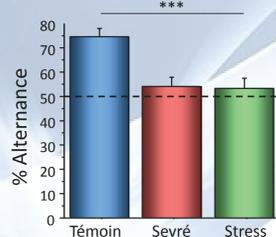
Mesure biologique: quantification dans le liquide céphalorachidien par microdialyse de la corticostérone afin de mesurer l'activité de l'axe corticotrope mis en jeu par le stress. **Evolution de la corticostérone comparable entre les animaux sevrés et stressés après un test.**

Comment mesurer les performances mnésiques ?



Labyrinthe en T

Test reposant sur la tendance spontanée des souris à visiter les bras en alternance. Permet de mesurer la mémoire de travail.



Résultat: les souris sevrées et stressées présentent un % réduit d'alternance, traduisant un déficit de mémoire de travail par rapport aux animaux témoins.

Comment mesurer les modifications épigénétiques ?

La méthode d'immunohistochimie permet de marquer à l'aide d'anticorps, uniquement les neurones où les résidus Lysines sont acétylés.

Cette technique est réalisée afin de déterminer si les souris sevrées et stressées présentent une perturbation de l'acétylation après le test du labyrinthe en T. Le marquage est quantifié dans deux structures impliquées dans la mémoire:



Cortex préfrontal



Hippocampe Dorsal

Finalité et Applications potentielles

Caractériser les perturbations provoquées par le sevrage → Tester l'effet d'agents pharmacologiques

- Déterminer quels agents pharmacologiques sont les plus efficaces pour traiter la dépression provoquée par un sevrage à l'alcool.
- Atténuer l'impact délétère du sevrage à l'alcool sur les fonctions cognitives.
- Mieux comprendre le lien entre le stress et la mémoire.

Améliorer les traitements et l'accompagnement médical durant le sevrage à l'alcool.

Annexe 8: Poster FENS

Introduction

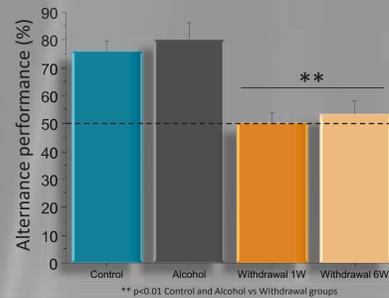
Working memory (WM) is the capacity to keep information in mind “online” for brief periods of time. During alcohol withdrawal, prolonged cognitive alterations are reported and particularly WM deficits. In this study, we examined in mice whether 6 months of chronic consumption alcohol or short (1 week, 1W) or long (6 weeks, 6W) alcohol withdrawal periods causes WM deficits and affects activation/phosphorylation of the transcription factor CREB (pCREB) and specific histone acetylation in the prefrontal cortex and hippocampus.

In this study, the WM was studied in a sequential alternation task constituted by a series of 7 successive trials separated by a 90 seconds delay in a T-maze.

Experiment 1

Behavioral and molecular consequences of alcohol-consuming and withdrawal

Sequential alternation task in a T-maze

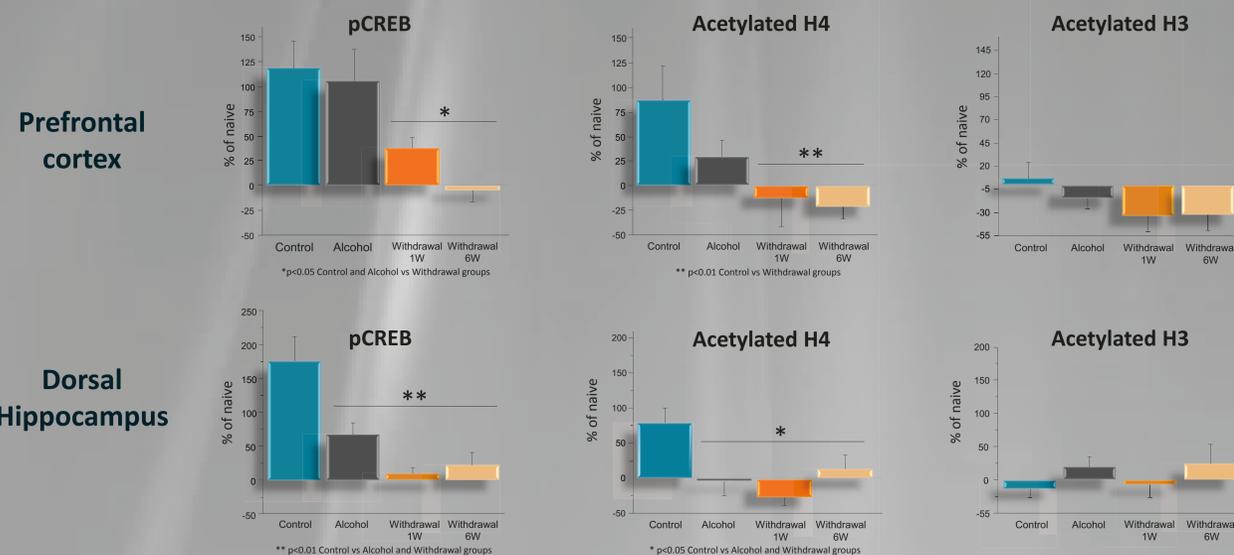


→ WM was not altered in alcohol group when compared with control water-drinking mice

→ In contrast, both withdrawn 1W and 6W mice are cognitively impaired relative to control and alcohol animals.

Immunodetection of pCREB and histone acetylation levels in alcohol and withdrawal groups after WM

All mice were sacrificed 30 min after WM task for immunohistochemistry. The results are presented as percentage of naive (naive controls killed directly from their home-cages).



Levels of pCREB and histone H4 acetylation (but not H3 acetylation) were increased after WM in both structures of water-control, but not Alcohol-consuming mice.

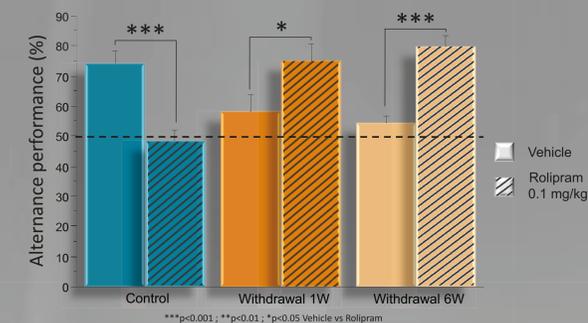
In withdrawal groups, WM deficits correlated with reduced pCREB and acetylated H4 levels in both structures.

Experiment 2

Behavioral and molecular effects of Rolipram in withdrawn mice

Sequential alternation task in a T-maze

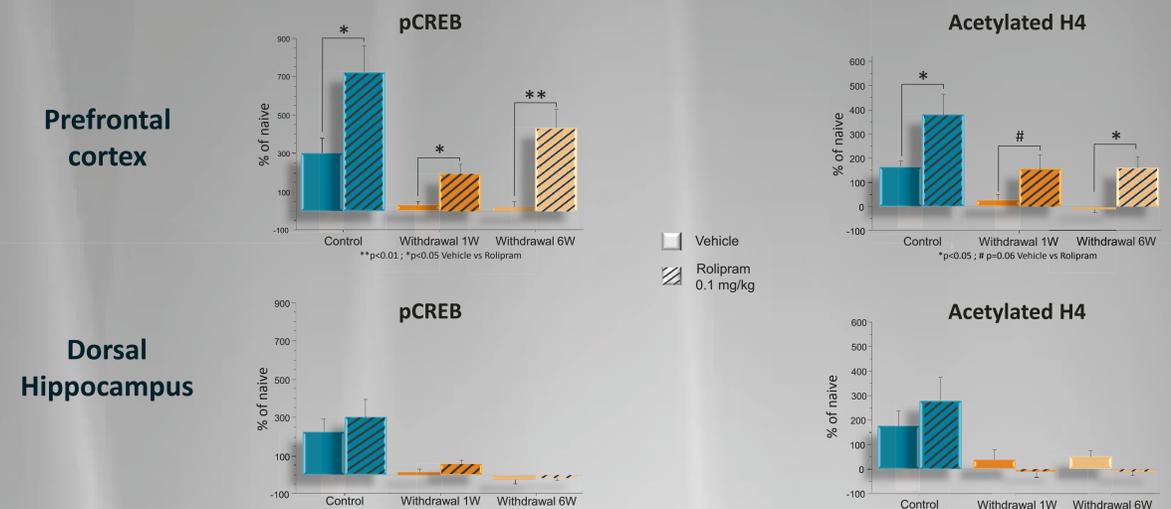
- Acute Rolipram treatment (0.1mg/kg) (a specific phosphodiesterase IV inhibitor) was performed 30 min before the task.



→ Acute Rolipram treatment induced opposite cognitive effects in water control group (memory impairment) and withdrawal groups (memory improvement).

Effects of rolipram on pCREB and H4 acetylation levels in withdrawal groups

All mice were sacrificed 30 min after WM task for immunohistochemistry. The results are presented as a percentage of naive (home-cages).

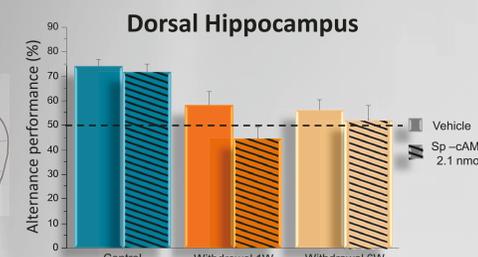
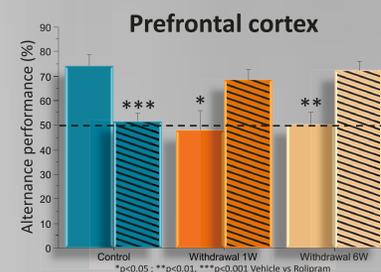
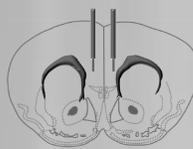


Acute rolipram treatment rescued (withdrawal) or enhanced (water controls) pCREB and H4 acetylation levels in the prefrontal cortex but not the hippocampus, as compared to vehicle-treated mice.

Experiment 3

Differential effects of prefrontal or hippocampal cAMP-PKA activation on withdrawal-related WM deficits

- Bilateral infusions of Sp-cAMP (2.1nmol) (specific activator of PKA) were realized 15 min before WM task.



→ Bilateral infusions of Sp-cAMP into the prefrontal cortex rescued WM deficits in withdrawal mice, whereas disrupting WM in water control ones.

→ No similar effects were seen after bilateral infusions of Sp-cAMP into the dorsal hippocampus.

Discussion

Our results indicate that WM deficits in withdrawal mice were closely associated with altered levels of CREB phosphorylation and H4 acetylation in the prefrontal cortex and dorsal hippocampus. Interestingly, no similar WM deficits and reduced pCREB in the prefrontal cortex were seen in alcohol mice. Our pharmacological data demonstrate that activation of prefrontal CREB function following systemic Rolipram treatment or bilateral infusion of Sp-cAMP into the prefrontal cortex rescues the withdrawal-related WM deficit.

In conclusions, these results evidenced the central role played by CREB phosphorylation disturbances in the prefrontal cortex in WM impairments resulting from alcohol withdrawal and further show that enhancers of the cAMP/PKA signaling pathway alleviate memory dysfunction resulting from alcohol withdrawal. Moreover, these data also indicate that the reduction of H4 acetylation is not involved in the WM deficit of alcohol- withdrawn mice, since the same dysfunction is also observed in alcohol mice which do not exhibit cognitive impairments.

Annexe 9: Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone



Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone

Gaëlle Dominguez^{1†}, Pierre Faucher^{2†}, Nadia Henkous², Ali Krazem², Christophe Piérard³ and Daniel Béracochea^{2*}

¹ INSERM U-930, Université François Rabelais, Parc Grandmont, Tours, France

² Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Nouvelle Université de Bordeaux, Talence, France

³ IRBA - Unité Neuropsychopharmacologie - Brétigny sur Orge, France

Edited by:

Valérie Doyère, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Anne-Marie Mouly, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, France

Valery Grinevich, German Cancer Research Center DKFZ and University of Heidelberg, Germany

*Correspondence:

Daniel Béracochea, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Nouvelle Université de Bordeaux, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France
e-mail: daniel.beracochea@u-bordeaux1.fr

[†] These authors have contributed equally to this study.

Most of the deleterious effects of stress on memory retrieval are due to a dysfunction of the hippocampo-prefrontal cortex interplay. The role of the stress-induced regional corticosterone increase in such dysfunction remains however unclear, since there is no published study as yet dedicated to measuring corticosterone concentrations simultaneously in both the prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (dHPC) in relation with memory impairments. To that aim, we first showed in Experiment 1 that an acute stress (3 electric footshocks; 0.9 mA each) delivered before memory testing reversed the memory retrieval pattern (MRP) in a serial discrimination task in which mice learned two successive discriminations. More precisely, whereas non-stressed animals remembered accurately the first learned discrimination and not the second one, stressed mice remembered more accurately the second discrimination but not the first one. We demonstrated that local inactivation of dHPC or mPFC with the anesthetic lidocaine recruited the dHPC activity in non-stress conditions whereas the stress-induced MRP inversion recruited the mPFC activity. In a second experiment, we showed that acute stress induced a very similar time-course evolution of corticosterone rises within both the mPFC and dHPC. In a 3rd experiment, we found however that *in situ* injections of corticosterone either within the mPFC or the dHPC before memory testing favored the emergence of the mPFC-dependent MRP but blocked the emergence of the dHPC-dependent one. Overall, our study evidences that the simultaneous increase of corticosterone after stress in both areas induces a shift from dHPC (non-stress condition) to mPFC-dependent MRP and that corticosterone is critically involved in mediating the deleterious effects of stress on cognitive functions involving the mPFC-HPC interplay.

Keywords: stress, glucocorticoids, microdialysis, hippocampus, prefrontal cortex

INTRODUCTION

Pathological states of memory encountered in stress-related disorders are mainly linked to dysfunction of the mPFC-HPC interplay. Thus, glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid receptors (MR), which exhibit a different affinity for corticosterone, are heavily expressed in the hippocampus, the amygdala and medial prefrontal cortex (mPFC) (Reul and de Kloet, 1985; de Kloet et al., 1986; Van Eekelen et al., 1988). Given the localization of GRs receptors, memory impairments induced by exposure to a stressor or glucocorticoids (GCs) are mainly correlated to altered plasticity into the hippocampus, the amygdala and the prefrontal cortex (Maroun and Richter-Levin, 2003; Jay et al., 2004; Vouimba et al., 2004; Sandi et al., 2005).

From a cognitive point of view, cortisol-induced deficits in declarative memory retrieval are associated with a decrease in hippocampal activity in humans, (de Quervain et al., 2003) alike corticosterone-induced deficits in rodents (de Quervain et al., 1998; Roozendaal, 2002; Roozendaal et al., 2003, 2004a,b).

Endogenous GCs have also been found to bear an essential role in maintaining prefrontal cortical cognitive functions, mainly via an interaction with dopaminergic and glutamatergic receptors (Mizoguchi et al., 2003, 2004; Yuen et al., 2009). The impact of GCs on cognitive functions is however not uniform. GCs effects on memory processes tend *either* to occur gradually over time via transcriptional regulation initiated by intracellular receptor activation (McEwen and Sapolsky, 1995; McGaugh and Roozendaal, 2002; Joels et al., 2006) *or* may develop rapidly along a non-genomic pathway through membrane receptor activation (Borski, 2000; Falkenstein et al., 2000; Caudal et al., 2010; Chauveau et al., 2010; Conboy and Sandi, 2010; Chaouloff and Groc, 2011; Dorey et al., 2011). Recent findings have underscored striking shifts in the levels of both MRs and GRs that varied by brain regions (Segal et al., 2010) but also time after stress. More specifically, we recently reported a triple dissociation as regards the time-course involvement of the hippocampal regions, corticosterone rises and glucocorticoid receptor types in relation with

memory retrieval impairments after acute stress (Dorey et al., 2012).

It is noteworthy that we previously provided unequivocal evidence to the effect that the dHPC and mPFC simultaneously interact at the time of retrieval in a contextual serial discrimination task (CSD). Thus, we evidenced that an acute stress delivered before memory testing reversed the memory retrieval pattern (MRP) in a serial discrimination task in which mice learned two successive discriminations. More pointedly, whereas non-stressed animals remembered accurately the first learned discrimination and not the second one within a series, stressed mice remembered more accurately the second discrimination but not the first one. Moreover, the MRP under non-stress conditions was critically dependent on the dHPC but not on mPFC, whereas the opposite was observed under stress conditions (Chauveau et al., 2008, 2009, 2010; Tronche et al., 2010).

The role of corticosterone in the stress-induced MRP inversion is however not known. Indeed, a previous study from our team has shown that an i.p. metyrapone injection (an inhibitor of the synthesis of corticosterone) before stress delivery totally blocked the stress-induced inversion of the MRP (Chauveau et al., 2010). This result evidenced that corticosterone is crucial to induce the memory retrieval dysfunction resulting from stress delivery in the CSD task. However, we did not investigate as yet the role of the stress-induced regional corticosterone increases in the emergence of the mPFC-dependent pattern after stress and the concomitant blockade of the dHPC-dependent one.

Hence, insofar as our earlier results were collected from lesioned animals, we elected therefore to further probe in an additional experiment the effect of local inactivation of either the

mPFC or dHPC by *in situ* infusion of the anesthetic lidocaine (a sodium channel blocker) on MRP, with a view to eliciting supplementary evidence as regards their distinctive involvement on MRPs under stress and non-stress conditions, respectively. In Experiment 2, using double intracerebral microdialysis, we measured the time-course evolutions of corticosterone rises after stress delivery *simultaneously* into the mPFC and dHPC in the same animal. Given the data obtained, we performed in Experiment 3, direct injections of corticosterone into either the mPFC or dHPC before memory testing, to ascertain the impact of the regional increase of corticosterone concentrations in each brain area on MRP.

MATERIALS AND METHODS

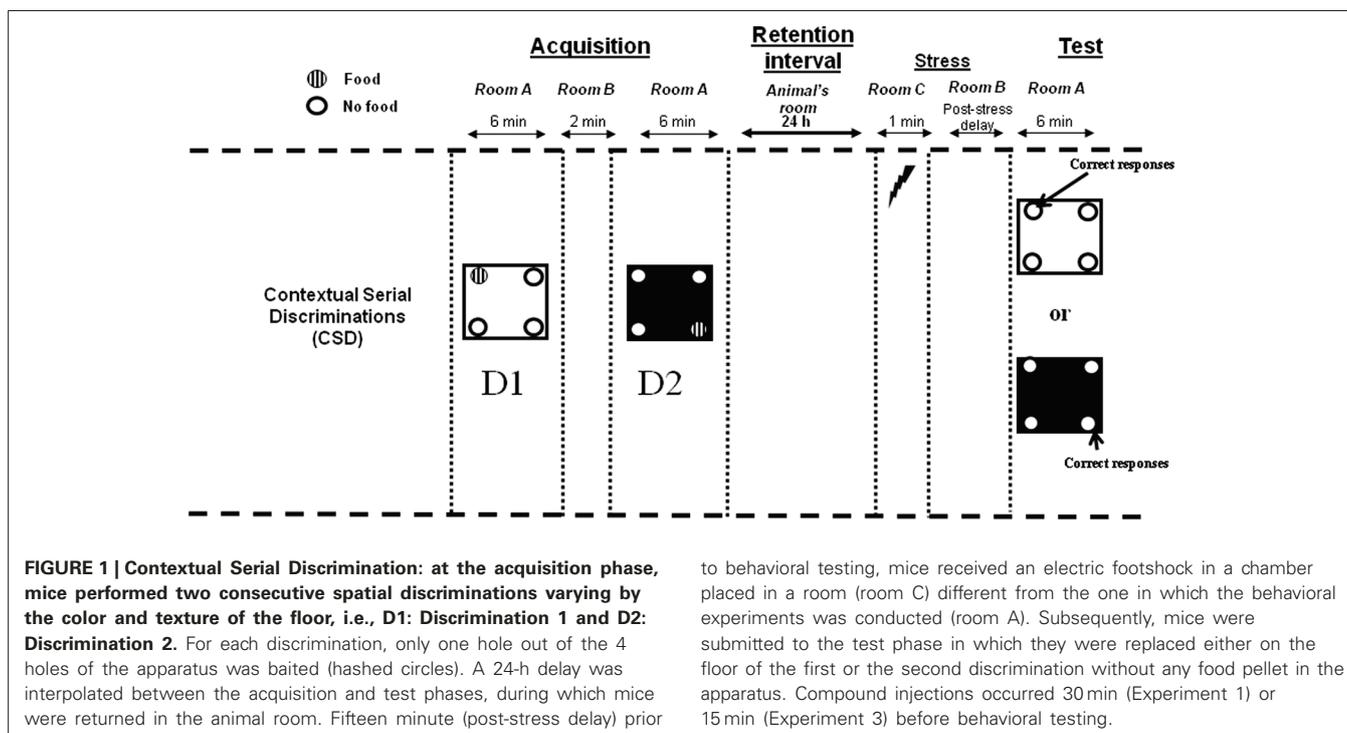
ANIMALS

Animals were 6 month-old naive male mice of the C57 Bl6/J inbred strain obtained from Charles River (L'Arbresle, France). They were randomly assigned to the various behavioral experiments. Animal weight ranged between 28 and 32 g. They were housed individually with free access to food and water on a 12 h light-dark cycle in a temperature controlled and ventilated room. All procedures were conducted during the light phase of the cycle between 08.00 a.m. and 12.00 p.m. All subjects were maintained at 85–90% of their *ad libitum* body weight throughout the behavioral study.

All procedures complied with the European Communities Council Directive 2010/63/EU for animal experiments.

BEHAVIORAL TEST

The experimental design is described in **Figure 1**.



APPARATUS

The hole-board

All tests were performed in a four-hole board apparatus (45 × 45 × 30 cm high) enclosed by gray Plexiglas. The four-hole board apparatus was placed on the floor of the room (3.0 × 3.0 × 2.40 m high). The floor of the board was interchangeable (white and smooth; black and rough). On the floor, 4 holes opening on a food cup (3 cm diameter × 2.5 cm in depth) were located 6 cm away from the sidewalls. The apparatus was placed in a room exposed to a 60 dB background noise and a light centered over the apparatus provided 20 lux intensity at the position of the apparatus. The environmental spatial cues were made of colored and striped paper sheets stuck on the walls of the room, and positioned at 1.00 m above the floor. These allocentric spatial cues remained at the same place throughout the acquisition and memory retrieval testing phases. The apparatus was cleaned with 70% ethanol and then with water before each mouse behavioral testing. Photocells placed in each hole were used to evaluate the number of head-dips in the 4 holes.

The stress chamber

Stress was delivered in a stress chamber (20 × 15 × 15 cm) which was enclosed with Plexiglas walls, one transparent and the three others painted brown. The floor of the conditioning chamber consisted of 35 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 5 mm apart and wired to a shock generator for the delivery of the three successive foot-shocks (0.9 mA; 1 s). Mice were placed in the conditioning chamber for 1 min and received three successive electric footshocks after 10, 30, and 50 s. The stress chamber was placed in a different room (room C) from the one used for the learning task (room A; see **Figure 1**) and was cleaned with 95% ethanol then with water between each mouse.

Contextual and Serial Discrimination task (CSD) protocol.

Behavioral memory testing was conducted in room A (**Figure 1**). For each discrimination, mice were first placed at the center of the board in a PVC tube for 15 s. Subsequently, the PVC tube was removed and mice could freely explore the four-hole board, with one hole being baited out of the 4 holes in the board. Mice learned two successive spatial discriminations (first discrimination, D1 and second discrimination, D2) for 6 min each. The two serial discriminations differed by the floor color and texture (white and smooth vs. black and rough), and were separated each by a 2 min time interval during which the mouse was placed in its home cage in room B. Further, the sequencing of the two different floors in the series (1st vs. 2nd discrimination) was systematically alternated from one mouse to another within each group. For discrimination 1, 10 20 mg pellets were available only in one of the four holes in the board. The baited hole for discrimination 1 was chosen at random. For discrimination 2, 10 20 mg pellets were systematically located in the diagonally opposite hole. Subjects which did not eat at least 8 pellets at D1 and D2 within the 6 min period were discarded from analysis.

Behavioral analysis

In the retrieval phase, for each discrimination, the percentage of “correct responses” was considered to measure memory (number

of explorations into the previously baited hole of the same internal (floor) context/total number of explorations × 100.; see **Figure 1**).

EXPERIMENT 1

The number of animals per group for memory testing in discriminations 1 and 2 was as follows: Lidocaine + Stress; $N = 10$; Lidocaine non-stress; $N = 8$; Vehicle + stress, $N = 8$; Vehicle non-stress, $N = 8$.

SURGERY

Subjects were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg; Panpharma) and xylazine (10 mg/kg; Sigma) injected i.p. and then placed in a stereotaxic apparatus (Kopf). Xylocaine (5%; AstraZeneca) was applied locally before opening the scalp and trepanation. Animals were bilaterally implanted in the prelimbic cortex (termed in this study as “mPFC”) with stainless steel guide cannulae (length: 8 mm; outer diameter 0.46 mm; inner diameter 0.255 mm; Le Guellec tubular components, France), according to the following stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001): anteroposterior relative to bregma, AP: +1.78 mm; lateral to the sagittal line, L: ±0.3 mm; ventral from the skull surface, V: −1.25 mm. A similar procedure was used for dHPC implantations at the following coordinates: AP = −2.0 mm; L = ±1.4 mm; V = −0.9 mm. The incisor bar was leveled with the interaural line. Sterile stylets were inserted in the cannulae to maintain patency. Mice were allowed to recover from surgery for 2 weeks before behavioral testing. Mice of the sham-operated groups underwent the same surgical procedures, and received the same amount of the vehicle solution. Guide-cannulae were fixed in place with dental cement and three micro screws attached to the skull.

INJECTION PROCEDURE

Lidocaine (0.06 nmol/0.3 mL; Sigma) was dissolved in PBS (pH 7.4) (Vandesquille et al., 2013). All animals were given the vehicle solution (artificial cerebrospinal fluid, aCSF; Phymep) 30 min before the acquisition phase.

During the test phase, all mice were gently restrained while the stylets were removed and replaced with the injection needles that extended 2.25 mm beyond the skull surface. The vehicle or lidocaine solutions were bilaterally infused 30 min before behavioral testing using a syringe pump (Braun Perfusor VI; Roucaire) set at a flow rate of 0.1 μL/min, using 1 μL Hamilton syringes. Needles were kept in place for 5 min after completion of the infusion to avoid back up into guide cannulae, and to enhance local spreading of the solutions within the tissue.

EXPERIMENT 2: PLASMA AND REGIONAL CORTICOSTERONE CONCENTRATIONS USING DOUBLE-MICRODIALYSIS

The experiments were conducted between 8:00 and 11:00 AM. Plasma corticosterone concentrations were measured on independent groups of mice at either 15, 30, 60, 90, 105, or 120 min post-stress delay intervals (7 mice per group). Control animals ($N = 7$) were submitted to the same experimental conditions but did not receive electric footshocks. The time course evolution

of corticosterone concentrations (microdialysis experiment) was measured on 7 animals.

SURGERY

Subjects were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg; Panpharma) and xylazine (10 mg/kg; Sigma) injected i.p. and then placed in a stereotaxic apparatus (Kopf). Xylocaine (5%; AstraZeneca) was applied locally before opening the scalp and trepanation.

Two microdialysis guide-cannulae (CMA/7 Microdialysis probe, CMA Microdialysis, Sweden) were implanted at the following coordinates from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001): mPFC: AP: +1.8 mm; L: ± 0.3 mm; V: -1.25 mm; for dHPC: AP = -2.0 mm; L = ± 1.3 mm; V = -1.0 mm. The laterality of implantation in dHPC and mPFC regions was randomized since half of the animal was implanted in the right side for dHPC and left side for mPFC whereas the other half was implanted in the opposite way.

Guide-cannulae were fixed with dental cement and three micro screws attached to the skull. All operated mice were allowed to recover for 15 days in the animal room. The day before the experiment, the microdialysis probes were introduced through the guide-cannulae and lowered 1 mm below so that the microdialysis membrane was located into dHPC or mPFC. This protocol allows the mouse to become familiar with the microdialysis bowl and whole microdialysate set up. During the night, mice were continuously perfused with sterile filtered Dulbecco's solution (mock CSF) at a rate of $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$.

Microdialysis

The experiment was carried out between 8:00 and 11:00 AM. Microdialysis was performed in freely moving animals to determine corticosterone levels in dHPC and mPFC after acute stress. All animals were food deprived for the behavioral and immunohistological studies at the time of measurements. The acute stress was applied in the microdialysis bowl and involved the same 3 successive unavoidable electric footshocks as exerted in the framework of the behavioral experiments. On the day of microdialysis measurements, probes (CMA/7, membrane length 1 mm; CMA Microdialysis, Sweden) were continuously perfused with sterile filtered Dulbecco's solution (mock CSF) at a rate of $1.0 \mu\text{l}/\text{min}$. After this equilibration phase, baseline dialysates (15 min samples) were collected with a flow rate of $1.0 \mu\text{l}/\text{min}$ during 1 h. Then, dialysates were collected during 2 additional hours after stress (flow rate: $1 \mu\text{l}/\text{min}$; sampling delay: 15 min). Samples were stored at -80°C before analysis. Free corticosterone levels measured in the dialysates were expressed in relative concentrations as the percentage of the 3 averaged baseline values.

Intra-hippocampal and mPFC corticosterone assays

An Enzyme Immunoassay commercial kit (Correlate-EIA™, Assay Designs, Ann Arbor, USA) was used to measure dHPC and mPFC corticosterone concentrations in the microdialysates. The sensitivity of the assay was 18.6 pg/ml . Therefore, baseline sample concentration was more than 10-fold above the sensitivity threshold.

Plasma corticosterone measurements

All animals were food deprived similarly to the behavioral studies. Mice were placed in a footshocks delivery system located in the microdialysis bowl, for at least 1 h before being administered with the same electric footshocks used in the behavioral and microdialysis experiments. After stress, they remained in the microdialysis cage and were decapitated to collect trunk blood after either 15, 30, 60, 90, 105, or 120 min post-stress delays. Control animals were submitted to the same experimental conditions but did not receive electric footshocks. They were killed 1 h after being placed in the microdialysis bowl. Thus, these animals constitute a "time 0" control group. After centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min, the supernatant was stored at -80°C until ELISA assay (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, USA).

EXPERIMENT 3: EFFECTS OF INTRACEREBRAL CORTICOSTERONE INJECTIONS INTO THE mPFC OR dHPC ON MEMORY PATTERNS

This experiment aimed at determining whether intra-hippocampus or intra-PFC corticosterone injections produced a modification of the MRP, similar to that induced by the acute stressor in the CSD task. For both discriminations 1 and 2, memory performance of corticosterone-injected mice into the dHPC ($N = 9$) was compared to groups receiving the vehicle solution ($N = 9$). Memory performance for discrimination 1 of corticosterone-injected mice into the mPFC was compared to a vehicle group ($N = 10$ and 9 , respectively); similarly, for discrimination 2, corticosterone-injected group was compared to a vehicle-injected group ($N = 9$ in both cases).

As in Experiment 2, the same anesthetic and surgical procedures were used for surgery. Animals were implanted bilaterally with stainless steel guide cannulae (length: 8 mm; outer diameter 0.46 mm; inner diameter 0.255 mm; Le Guellec tubular components, France), according to the following stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001): Prelimbic cortex. anteroposterior relative to bregma, AP: +1.78 mm; lateral to the sagittal line, L: ± 0.3 mm; ventral from the skull surface; V: -1.25 mm. For dHPC: AP = -2.0 mm; L = ± 1.4 mm; V = -0.9 mm. The incisor bar was leveled with the interaural line. Sterile stylets were inserted in the cannulae to maintain patency. Mice were allowed to recover from surgery for 2 weeks before behavioral testing. Mice of the sham-operated groups underwent the same surgical procedures, and received the same amount of the vehicle solution. Guide-cannulae were fixed in place with dental cement and three micro screws attached to the skull.

The corticosterone dose was chosen according to previous studies from our team (Dorey et al., 2012; Minni et al., 2012; Moisan et al., 2014). Corticosterone (Sigma, France) was diluted in an artificial cerebrospinal fluid at the concentration of 1 mg/ml , and bilaterally injected ($0.5 \mu\text{l}$ per side into the dHPC and $0.4 \mu\text{l}$ per side into the mPFC). The vehicle and corticosterone solutions were bilaterally infused using a syringe pump (Braun Perfusor VI; Roucaire) set at a flow rate of $0.1 \mu\text{l}/\text{min}$, using $1 \mu\text{l}$ Hamilton syringes. Needles were kept in place for 5 min after completion of the infusion to avoid back up into guide cannulae.

In the acquisition phase, all animals were given the vehicle solution 15 min before the learning of both discriminations. In

the test phase, within the framework of the experimental conditions, corticosterone and the vehicle solutions were injected 15 min before the test session.

HISTOLOGY

Immediately after behavioral testing (Experiments 1 and 3) or microdialysis measurements (Experiment 2), mice were killed by cervical elongation and decapitated to remove brain which was subsequently soaked in a 10% formaldehyde solution over 10 days. At the end of this period, the brains were soaked in a saccharose-formaldehyde solution (10% formaldehyde solution +30% sucrose) during 2 days. Brains were then sectioned coronally (50 μ m thickness in successive slices). A thionin (Sigma, France) stain was used to determine location of the guide-cannulae.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using the Statview 5.0 software. The data were analyzed using one way (factorial analyses) or Two-Ways (between factors interaction) analyses of variance (ANOVAs) followed, whenever adequate, by *post-hoc* comparisons (Bonferroni/Dunnett's test). Data were expressed as means \pm s.e.m. Comparisons of retrieval performances with chance level were calculated with one sample Student-t-test (with hypothesized mean = chance level of 50%). Microdialysis data were analyzed using One - or Two-Way repeated-measure ANOVA as appropriate, followed when adequate by *post-hoc* testing (Bonferroni/Dunnett's test). Within group comparisons of values with baseline level was calculated using one sample Student-t-test. "NS" means that "p" values are superior to 0.05 and are considered as non-statistically significant.

RESULTS

EXPERIMENT 1: EFFECTS OF intra-dHPC OR intra-mPFC LIDOCAINE INJECTIONS ON MRPs IN NON-STRESS AND STRESS CONDITIONS

Impact of lidocaine injections into the dHPC 30 min before memory testing in non-stress and stress conditions

Acquisition phase. All animals received the vehicle infusion 30 min before the acquisition phase. The acquisition phases of groups tested for discrimination 1 or 2 have been analyzed according to the latter random attribution of mice to groups (lidocaine or vehicle), conditions (stress vs. non-stress) and D1 or D2 memory testing. No difference between groups was observed on the total number of head-dips (NS in all comparisons).

Test phase. The total number of explorations is precised in **Table 1**. No difference was observed on the total number of head-dips among the groups injected into the dHPC for both discriminations 1 and 2 (see **Table 1A**).

Percentage of correct responses (A) first discrimination (D1). Data are represented in **Figure 2A**, left. ANOVA evidenced a significant difference between groups [$F_{(3, 30)} = 6.5$; $p < 0.001$]. More specifically, in non-stress condition, lidocaine injection induced an impairment of D1 responses ($25.2 \pm 2.0\%$) as compared to vehicle-injected mice ($46.4 \pm 5.0\%$; $p < 0.001$); stress induced a decrease of D1 responses ($27.2 \pm 2.6\%$); as compared

Table 1A | Total number of explorations during the test phase in dHPC-injected groups attributed to memory testing of the first discrimination and second discriminations.

dHPC	Discrimination 1	Discrimination 2
A Groups	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.	Total number of visits mean \pm s.e.m.
Vehicle non-stress	15.4 \pm 1.1	19.0 \pm 2.2
Vehicle stress	16.6 \pm 1.2	21.9 \pm 1.3
Lidocaine non-stress	14.5 \pm 0.8	17.1 \pm 2.6
Lidocaine stress	15.3 \pm 1.6	16.3 \pm 1.9

No significant difference between groups was observed.

Table 1B | Total number of explorations during the test phase in mPFC-injected groups attributed to memory testing of the first discrimination and second discriminations.

mPFC	Discrimination 1	Discrimination 2
B Groups	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.	Total number of visits mean \pm s.e.m.
Vehicle non-stress	17.1 \pm 3.3	16.6 \pm 4.2
Vehicle stress	19.7 \pm 2.8	20.2 \pm 4.3
Lidocaine non-stress	20.1 \pm 1.1	18.7 \pm 3.9
Lidocaine stress	18.6 \pm 3.6	17.1 \pm 4.1

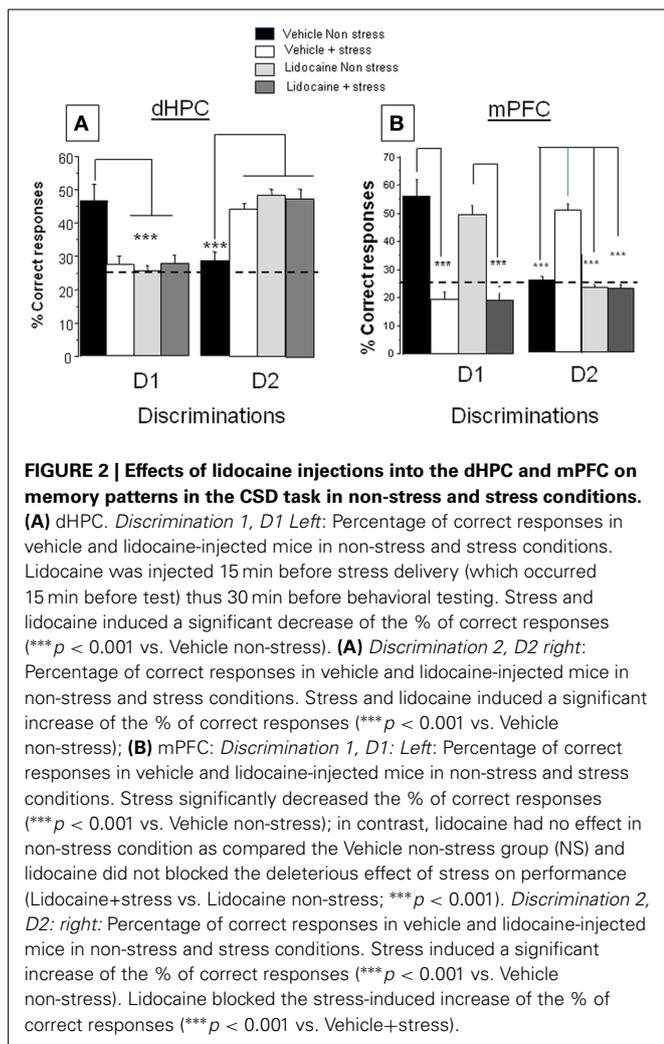
No significant difference between groups was observed.

to non-stressed animals ($46.4 \pm 5.0\%$; $p < 0.001$). Lidocaine injected before stress delivery did not modify performance as compared to non-stressed lidocaine injected mice ($27.5 \pm 2.9\%$ and $25.2 \pm 2.0\%$ respectively; NS) or as compared to stressed vehicles ($27.2 \pm 2.6\%$; NS).

Percentage of correct responses. (B) second discrimination (D2). Data are represented in **Figure 2A**, right. ANOVA showed a significant difference between groups [$F_{(3, 30)} = 12.3$; $p < 0.0001$]. More specifically, in non-stress condition, lidocaine injection before test induces an increase of D2 ($49.7 \pm 2.4\%$) as compared to mice receiving the vehicle solution ($28.9 \pm 2.2\%$; $p < 0.001$); stress induced an increase of D2 ($44.5 \pm 2.0\%$) as compared to non-stressed animals ($28.9 \pm 2.2\%$; $p < 0.001$). Lidocaine injected before stress delivery ($48.3 \pm 3.2\%$) did not modify performance as compared to lidocaine-injected mice ($49.7 \pm 2.4\%$; NS) or stressed vehicles ($44.5 \pm 2.0\%$; NS).

Impact of lidocaine injections into the mPFC 30 min before memory testing in non-stress and stress conditions

Acquisition phase. All animals received the vehicle infusion 30 min before the acquisition phase. The acquisition phase has been analyzed according to the latter random attribution of mice to groups, conditions (stress vs. non-stress) and D1 or D2 retrieval test phases. No difference was observed on exploratory patterns among groups (NS in all comparisons).



Test phase. The total number of explorations is precised in **Table 1**. No difference was observed on the total number of head-dips among the groups injected into the mPFC for both discriminations 1 and 2 (see **Table 1B**).

Percentage of correct responses. (A) first discrimination (D1). Data are represented in **Figure 2B**, left. ANOVA showed a significant difference between groups [$F_{(3, 32)} = 8.67$; $p < 0.0001$]. More specifically, stress induced a significant decrease of D1 responses (Stressed vehicles: $19.4 \pm 4.6\%$) as compared to non-stressed vehicles ($55.5 \pm 5.5\%$; $p < 0.001$). Lidocaine injection before stress did not modify performance ($20.1 \pm 2.4\%$) as compared to stressed vehicles ($19.4 \pm 4.6\%$; NS) whereas non-stressed lidocaine injected mice ($49.2 \pm 2.9\%$) behaved similarly to non-stressed vehicles ($55.5 \pm 5.5\%$; NS).

Percentage of correct responses. (B) second discrimination (D2). Data are represented in **Figure 2B**, right. ANOVA showed a significant difference between groups [$F_{(3, 32)} = 7.9$; $p < 0.0001$]. More specifically, stress induced a significant increase in the % number of D2 responses (stressed vehicles: $51.3 \pm 2.2\%$) as compared to non-stressed vehicles ($26.2 \pm 2.1\%$; $p <$

0.001). Lidocaine injection before stress significantly decreased the % number of D2 responses ($24.5 \pm 1.6\%$) as compared to stressed vehicles ($p < 0.001$) whereas non-stressed lidocaine-injected mice ($23.9 \pm 1.8\%$) behaved similarly to non-stressed vehicles ($26.2 \pm 2.1\%$; NS).

Conclusion. This experiment shows (i) that the MRP in stress conditions (D2 better retrieved than D1) is inverted as compared to the non-stress conditions (better D1 retrieval than D2); (ii) that the memory retrieval of D1 under non-stress conditions is sustained by the dHPC activity, whereas the emergence of D2 within stress conditions involves the mPFC activity.

EXPERIMENT 2: PLASMA CORTICOSTERONE AND TIME-COURSE EVOLUTIONS OF CORTICOSTERONE CONCENTRATIONS AFTER STRESS INTO THE dHPC AND mPFC

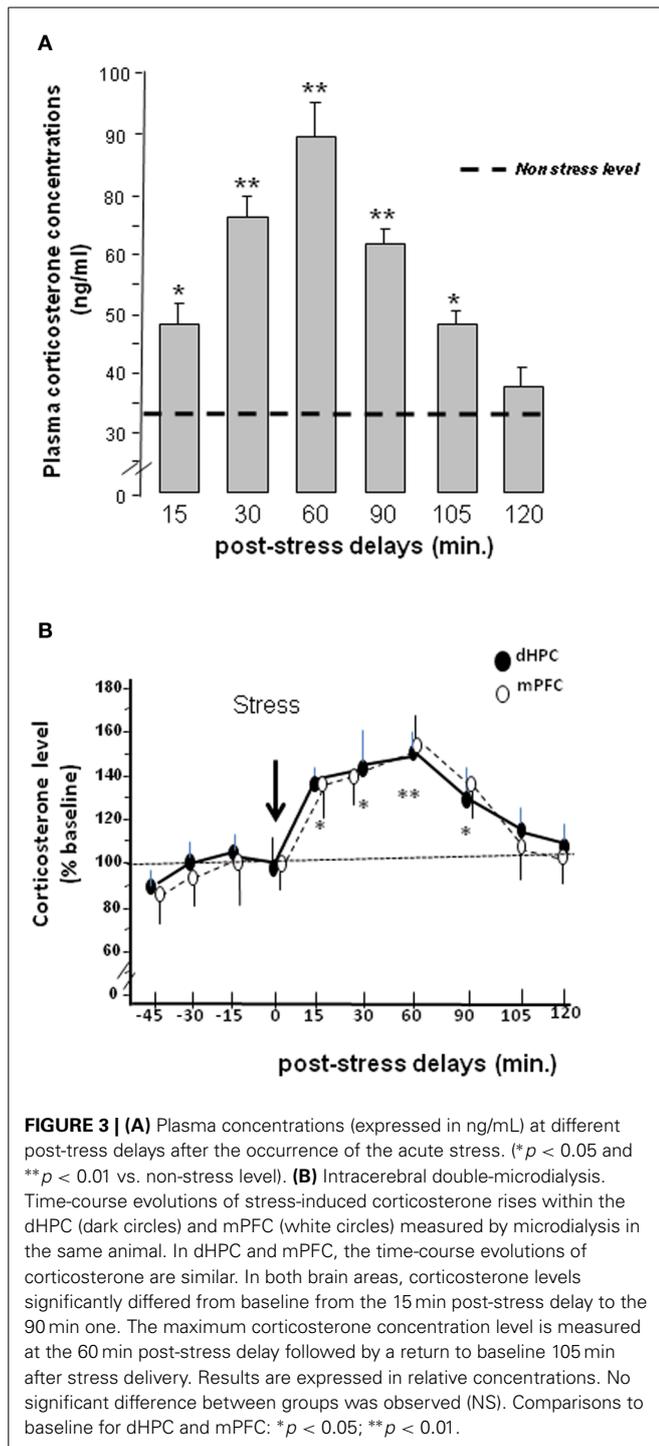
Plasma corticosterone assay

Data are represented in **Figure 3A**. ANOVA showed a significant difference between groups [$F_{(6, 42)} = 8.75$; $p < 0.001$]. More specifically, stress induced a significant increase of plasma corticosterone level at the post-stress delays of 15 min (49.8 ± 3.1 ng/ml; $p < 0.05$), 30 min (67.2 ± 5.4 ng/ml; $p < 0.01$), 60 min (89.1 ± 11.3 ng/ml; $p < 0.01$), 90 min (62.8 ± 4.9 ng/ml; $p < 0.01$) and at 105 min (47.1 ± 1.48 ng/ml; $p < 0.05$) as compared to non-stressed animals (34.2 ± 3.1 ng/ml). By contrast, the increase in corticosterone at the 120 min post-stress delay (38.7 ± 5.3 ng/ml) was not significantly different from that observed in non-stressed mice ($p > 0.10$).

Time-course evolution of corticosterone concentrations after stress into the dHPC or mPFC

Data are represented in **Figure 3B**. The absolute concentrations of baseline corticosterone levels in dialysates (i.e., mean \pm s.e.m. from 4 points measured before stress delivery) are not significantly different between dHPC and mPFC groups [386.9 ± 39.5 ng/l vs. 332.5 ± 39.8 ng/l respectively; $F_{(1,12)} < 1.0$; NS]. **Figure 4B** represents corticosterone levels in dHPC and mPFC areas in the same animals ($N = 7$) in which data are expressed in relative concentrations (i.e., as percentage of variation of baseline).

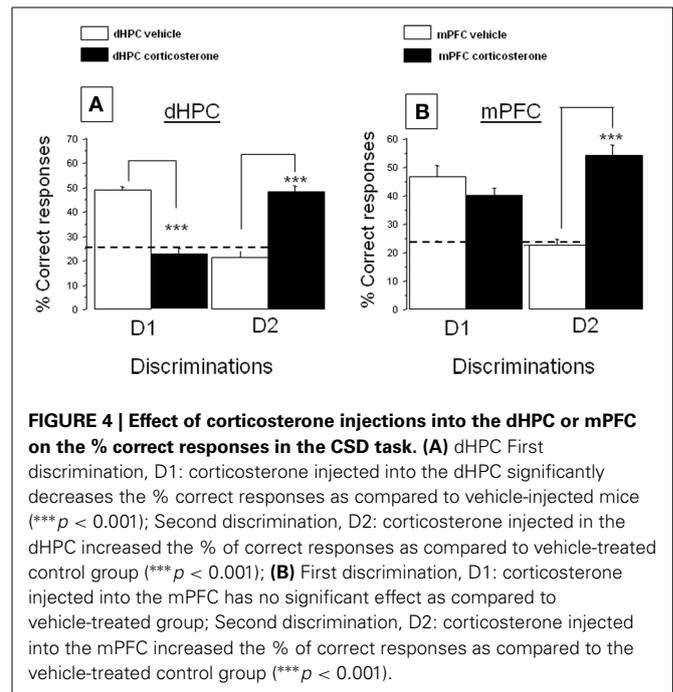
Repeated-measure ANOVAs performed on corticosterone kinetic evidenced a significant evolution of corticosterone over delays [$F_{(9, 108)} = 5.3$; $p < 0.0001$] but a non-significant interaction between brain areas and delays [$F_{(9, 108)} = 0.37$; NS]. Thus, the time-course evolutions of corticosterone rises in dHPC and mPFC groups after acute stress delivery are very similar. More specifically, stress induced in dHPC a progressive and significant increase in corticosterone levels as compared to the last pre-stress sample ($92.5 \pm 6.2\%$; “time = 0”), from 15 min ($136.7 \pm 5.2\%$; $t = 2.38$; $p < 0.05$) to 90 min ($121.1 \pm 4.1\%$; $t = 2.58$; $p < 0.05$). Furthermore, the highest difference was observed 60 min after stress administration ($146.1 \pm 4.7\%$; $t = 3.57$; $p < 0.01$). In the mPFC, stress induced a progressive and significant increase in corticosterone levels as compared to the last pre-stress sample ($98.8 \pm 3.9\%$; “time = 0”), from 15 min ($135.24 \pm 8.6\%$; $t = 2.48$; $p < 0.05$) to 90 min ($135.1 \pm 9.2\%$; $t = 2.82$; $p < 0.05$). Furthermore, the highest difference was also observed 60 min after stress delivery ($154.5 \pm 7.4\%$; $t = 3.49$; $p < 0.01$).



Conclusion. Stress induced significant time-course evolutions of corticosterone rises in both the mPFC and dHPC, which are similar in both brain structures.

EXPERIMENT 3: EFFECTS OF dHPC OR mPFC CORTICOSTERONE INJECTIONS ON MRPs IN THE CSD TASK

Given the data obtained in Experiments 1 and 2, we hypothesized that corticosterone likely enhances the mPFC-dependent



MRP and impaired the dHPC-dependent one. To appraise such a hypothesis, we injected corticosterone within the dHPC or the mPFC 15 min before memory testing. An ANOVA showed a significant difference between group on the % of correct responses both for the first [$F_{(3, 33)} = 19.4$; $p < 0.0001$] and second discrimination [$F_{(3, 32)} = 37.02$; $p < 0.0001$].

Impact of corticosterone injection into the dHPC on the memory retrieval of the first and second discriminations

Acquisition phase. All animals received the vehicle infusion 15 min before the acquisition phase. The acquisition phases of groups tested for discrimination 1 or 2 have been analyzed according to the latter random attribution of mice to groups (corticosterone or vehicle) and D1 or D2 retrieval test phases. No difference was observed on account of the total number of head-dips among the groups (NS in all comparisons).

Test phase. The total number of explorations is mentioned in **Table 2**. No difference was observed on the total number of head-dips among the groups injected into the dHPC for both discriminations 1 and 2 (see **Table 2A**).

(A) First discrimination (D1). Data are displayed in **Figure 4A**, left. More precisely, intra-dHPC injections of corticosterone induced a significant decrease of D1 responses ($22.2 \pm 3.0\%$) as compared to respective dHPC vehicles ($48.9 \pm 1.3\%$; $p < 0.001$).

(B) Second discrimination (D2). Data are represented in **Figure 4A**, right. More specifically, intra-dHPC injections of corticosterone induced a significant increase of D2 responses ($48.5 \pm 2.5\%$) as compared to dHPC vehicles ($21.4 \pm 2.6\%$; $p < 0.001$).

Impact of corticosterone injection into the mPFC over memory retrieval of the first and second discriminations

Acquisition phase. All animals received the vehicle infusion 15 min before the acquisition phase. The acquisition phases of groups tested for discrimination 1 or 2 have been analyzed according to the latter random allocation of mice to groups (corticosterone or vehicle) and D1 or D2 retrieval test phases. No difference was observed on the total number of head-dips among the groups (NS in all comparisons).

Test phase. The total number of explorations is mentioned in **Table 2B**. No difference was observed on the total number of head-dips among the groups injected into the mPFC for both discriminations 1 and 2.

First discrimination. Data are displayed in **Figure 4B**, left. Corticosterone did not decrease the % of D1 correct responses as compared to controls ($47.8 \pm 3.2\%$ vs. $54.4 \pm 4.4\%$, respectively; NS).

Second discrimination. Data are displayed in **Figure 4B**, right. Intra-mPFC injections of corticosterone induced a significant increase of D2 responses ($54.1 \pm 3.5\%$) as compared to controls ($22.4 \pm 2.2\%$; $p < 0.001$).

HISTOLOGY

In Experiments 1 and 3, independent groups of animals were implanted bilaterally either in the mPFC (prelimbic cortex) or in the dHPC. Representative microphotographs and the antero-posterior extent of the bilateral cannulae localizations into either the mPFC (A) or dHPC implantations (B) in animals used in Experiments 1 and 3 are provided in **Plate 1**. In Experiment 2

(microdialysis), guide-cannulae were implanted unilaterally in the same animal, one cannulae into the mPFC and the other into the dHPC, at the same stereotaxic coordinates as those used in Experiments 1 and 3. Implantations into the mPFC and the dHPC were alternated from one mouse to the other, to avoid possible laterality biases. Representative microphotographs and the antero-posterior extent of the cannulae localizations into the mPFC (A and C) and dHPC (B and D) in animals used for the microdialysis experiment are provided in **Plate 2**.

DISCUSSION

To sum up our findings, we showed in a first experiment that stress (electric footshocks) inverted the MRP in the CSD task as compared to non-stress conditions. Lidocaine injections 30 min before memory testing into either the mPFC or dHPC revealed that response patterning in non-stress conditions is sustained by dHPC activity whereas under stress conditions, it depended on mPFC activity. Thus, stress enhanced the mPFC-dependent MRP at the expense of the dHPC-dependent one. It is noteworthy indeed that *in vivo* double-microdialysis, provided unequivocal evidence to the effect that acute stress induced very similar time-course evolutions of corticosterone rises into the mPFC and dHPC. Thus, the stress-induced corticosterone rises at the time of memory testing in both areas were concomitant with the emergence of the mPFC-dependent MRP and the blockade of the dHPC one. In keeping with these findings, we tested in Experiment 3 the hypothesis that the corticosterone rise in the mPFC and dHPC may account for the blockade of the dHPC-dependent MRP and the concomitant emergence of the mPFC one after stress. Indeed, we found that *in situ* injections of corticosterone into either the mPFC or the dHPC

Table 2A | Total number of explorations during the test phase in dHPC-injected groups attributed to memory testing of the first discrimination and second discriminations.

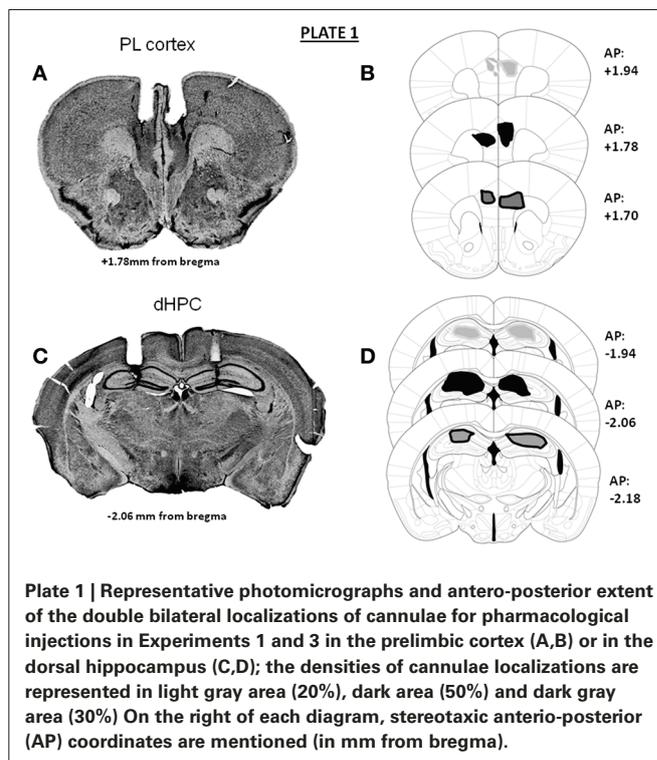
A dHPC	Discrimination 1	Discrimination 2
Groups	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.
Vehicle	17.5 ± 1.9	20.4 ± 3.6
Corticosterone	19.3 ± 2.2	18.9 ± 4.3

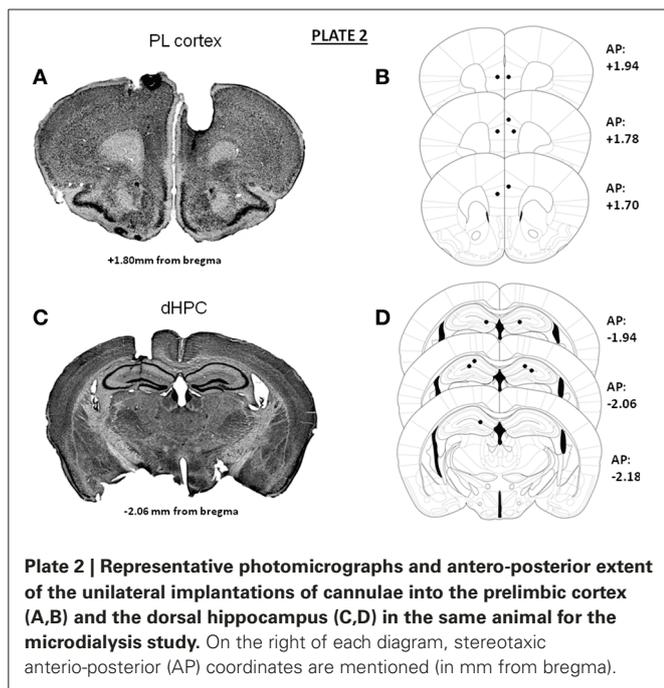
No significant difference between groups was observed.

Table 2B | Total number of explorations during the test phase in mPFC-injected groups attributed to memory testing of the first discrimination and second discriminations.

B mPFC	Discrimination 1	Discrimination 2
Groups	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.	Total number of head-dips mean \pm s.e.m.
Vehicle	19.4 ± 3.2	23.4 ± 3.2
Corticosterone	22.6 ± 4.1	20.5 ± 2.8

No significant difference between groups was observed.





both enhanced the mPFC-dependent MRP and impaired the dHPC-dependent one.

NEURAL NETWORKS IN THE CSD TASK UNDER NON-STRESS AND STRESS CONDITIONS

In the present study, the first experiment confirmed our previous findings showing that stress modifies the serial MRPs as compared to non-stressed mice (Chauveau et al., 2008, 2009; Tronche et al., 2010). More specifically, whereas memory retrieval of the first learned discrimination is predominant as compared to the second one in non-stress conditions, stress reversed this MRP, the second discrimination being better retrieved than the first one. Using selective inactivation of the mPFC or dHPC with lidocaine, we showed that the retrieval of information in stress condition recruited the mPFC whereas the dHPC is engaged in non-stress conditions. Indeed, in non-stress conditions, the retrieval of D1 is not impaired by lidocaine injection into the mPFC as compared to vehicle-treated mice; in contrast, the retrieval of D1 is severely impaired by lidocaine injection into the dHPC. Thus, in non-stress conditions, memory retrieval of D1 is critically dependent on dHPC but not on mPFC activity. The opposite is observed in stress conditions for D2 responses. Indeed, stress increases the memory retrieval of D2 at the expense of D1; however, whereas lidocaine injection into the dHPC did not impair memory retrieval of D2, it totally blocked the emergence of D2 in stressed animals when injected into the mPFC. These overall data led us to conclude that the emergence of D2 responses in stressed mice was dependent on the mPFC but not on dHPC activity. This conclusion is further sustained by the fact that lidocaine injected into the mPFC did not modify D1 responses both in stress and non-stress conditions as compared to vehicles. As further evidence, lidocaine injections into the dHPC did not modify D2 responses both in stress and non-stress conditions, as

compared to vehicles. Interestingly, we found that the different effects of lidocaine were transient, since they were observed when injected 30 min before memory testing as reported here, but not when injected 120 min before behavioral testing (*data not shown*).

Overall, our data released in our present study, prove singularly congruent with several studies showing that hippocampal lesions resulted in an initial retention deficit of an object-spatial location association (the equivalent of D1 in our study) and spared performance for a more recent one (the equivalent of D2 in the present study) (Jackson et al., 1998; Gilbert and Kesner, 2004). Our present data are also in agreement with studies showing that the dHPC and the mPFC play significant roles in memory for the serial order of spatial and non-spatial information (Fortin et al., 2002; Kesner et al., 2002; Hannesson et al., 2004; Lisman et al., 2005; Kesner and Hopkins, 2006). Interestingly, several studies have shown that there are multiple ways by which the dHPC and mPFC interact during memory testing; thus, a time-dependent sequential involvement of the HPC and mPFC in consolidation processes has been already evidenced (Frankland and Bontempi, 2005); however, our present study provides further evidence that the mPFC and the dHPC can also compete at the time of memory testing and that the expression of the dHPC or mPFC-dependent response depends on the conditions (non-stress vs. stress) in which memory retrieval occurred.

STRESS, CORTICOSTERONE, AND MEMORY RETRIEVAL

The role of corticosterone in the stress-induced inversion of MRP was already demonstrated in a previous study, in which we reported that the injection of metyrapone (an inhibitor of corticosterone synthesis) before stress delivery totally blocked the stress-induced inversion of the MRP in the CSD task (Chauveau et al., 2010). Our present study provides clear-cut evidence that the simultaneous stress-induced increase of corticosterone in the mPFC and dHPC generates opposite effects on mPFC and dHPC-dependent MRP. Indeed, we evidenced simultaneous corticosterone rises into both the dHPC and mPFC after stress delivery associated with both the emergence of the mPFC-dependent response and the parallel alteration of the dHPC-dependent one.

Interestingly, corticosterone injections did not exactly mimic the effect of stress on memory retrieval. Indeed, when corticosterone is injected into the mPFC, both D1 and D2 are well remembered; in contrast, stress impaired D1 and enhanced D2. This discrepancy may be explained by the fact that stress increases corticosterone concentrations both in the mPFC and the dHPC which resulted in a simultaneous enhancement of D2 and an impairment of D1. In contrast, the corticosterone injection specifically into the mPFC spared D1 response (sustained by dHPC activity) but enhanced D2 one.

The stress-induced rise of corticosterone into the dHPC plays a key role in the alteration of the dHPC-dependent response. Indeed, from a cognitive point of view, the effect of corticosterone rise into the dHPC is similar to that induced by the injection of lidocaine (Experiment 1) which resulted in a decrease of D1 response and an enhancement of the D2 one. Thus, an increased level of corticosterone into the dHPC results in an alteration of memory retrieval sustained by dHPC activity. This result is

congruent with studies showing that the memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression,—a finding which suggests that elevated adrenocortical activity is critical in mediating the memory deficits induced by HPC damage (Roozendaal et al., 2001). In contrast, the stress-induced corticosterone rise in the mPFC or direct injection of corticosterone into the mPFC in non-stressed animals induced an enhancement of D2 responses, i.e., favored the emergence of the mPFC-dependent MRP. This finding is in sharp contrast with studies having reported that GCs can disrupt mPFC-dependent memory (Roozendaal et al., 2004b; Cerqueira et al., 2005). However, the effect of corticosterone on memory depends on interactions with other local neurotransmitters within the mPFC; indeed, it has been already reported that endogenous GCs are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function by interacting with the dopaminergic D₁ receptor (Mizoguchi et al., 2004); more recently, GCs in the prefrontal cortex of rats have been reported to enhance memory consolidation whereas they impaired working memory by a common neural mechanisms, which critically depended on the interaction with the noradrenergic activity within the prefrontal cortex (Barsegyan et al., 2010). Another study reported an improvement of working memory after stress due to an enhancement of glutamatergic transmission in the prefrontal cortex (Yuen et al., 2009). Thus, the opposite effect of corticosterone on mPFC and dHPC functions could be mediated either by the interaction of corticosterone with other local neurotransmitters or by regional differences in MR and GR receptors densities within each area. It is indeed well established that corticosterone alters neural plasticity via an increase of phospho-CREB levels which depend on the activation of membrane-associated glucocorticoid receptors (Roozendaal et al., 2010). Thus, low (non-stress condition) and high (stress condition) levels of corticosterone concentrations definitely affect regional neural plasticity as well as the interaction between GCs and dopaminergic, glutamatergic, and GABAergic transmissions, which normally equilibrate excitation and inhibition within the HPC-PFC network (see in Curley and Lewis, 2012; Godsil et al., 2013). Further studies will be performed to ascertain the impact of the stress-induced corticosterone rises on brain regional neural plasticity using immunohistochemical approaches.

In conclusion, by using a dynamic approach of the time-course evolution of corticosterone levels our study herein evidenced that acute stress induced similar corticosterone rises in the mPFC and dHPC over time, that produced a shift from dHPC-dependent MRP (non-stress condition) to mPFC-dependent one. By and large, our study demonstrates that corticosterone bears differentiated functional effects on the activity of the dHPC and mPFC, and is essential in mediating the deleterious effects of stress on the mPFC-HPC interplay.

DISCLOSURE

We wish to extend the following statements: except for income received from primary employers, no financial support nor any compensation has been received from either any individual or corporate entity over the past 3 years whether dedicated to either research or professional service in relation with this study. Further, no single personal financial holding may exist nor be

perceived as constituting a potential conflict of interest. All authors of the study display no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the CNRS and by a grant (Operation n1 03co015-05—PEA 010801) from DGA/DET/SCET/CEP/SHP, Paris, France. We also thank Laurence Decorte for her help in histological analyses, and Dominique Panzeri and Nathalie Argenta for animal's care. We also like to thank Dr. Frances Ash for language proofreading (contact: ashberac@free.fr).

REFERENCES

- Barsegyan, A., Mackenzie, S. M., Kurose, B. D., McGaugh, J. L., and Roozendaal, B. (2010). Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16655–16660. doi: 10.1073/pnas.1011975107
- Borski, R. J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 427–436. doi: 10.1016/S1043-2760(00)00325-8
- Caudal, D., Godsil, B. P., Mailliet, F., Bergerot, D., and Jay, T. M. (2010). Acute stress induces contrasting changes in AMPA receptor subunit phosphorylation within the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus. *PLoS ONE* 5:e15282. doi: 10.1371/journal.pone.0015282
- Cerqueira, J. J., Pêgo, J. M., Taipa, R., Bessa, J. M., Almeida, O. F., and Sousa, N. (2005). Morphological correlates of corticosteroid-induced changes in the prefrontal cortex-dependent behaviors. *J. Neurosci.* 25, 7792–7800. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1598-05.2005
- Chaouloff, F., and Groc, L. (2011). Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 25–42. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.07.004
- Chauveau, F., Tronche, C., Pierard, C., Coutan, M., Drouet, I., Liscia, P., et al. (2008). Prefrontal cortex or basolateral amygdala lesions blocked the stress-induced inversion of serial memory retrieval pattern in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 395–403. doi: 10.1016/j.nlm.2008.04.014
- Chauveau, F., Tronche, C., Pierard, C., Coutan, M., Drouet, I., Liscia, P., et al. (2009). The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress condition. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 447–455. doi: 10.1016/j.nlm.2008.12.003
- Chauveau, F., Tronche, C., Piérard, C., Liscia, P., Drouet, I., Coutan, M., et al. (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20, 196–207. doi: 10.1002/hipo.20605
- Conboy, L., and Sandi, C. (2010). Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action. *Neuropsychopharmacology* 35, 674–685. doi: 10.1038/npp.2009.172
- Curley, A. A., and Lewis, D. A. (2012). Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *J. Physiol.* 590, 715–724. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224659
- de Kloet, E. R., Reul, J. M., de Ronde, F. S., Bloemers, M., and Ratka, A. (1986). Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuro-peptides. *J. Steroid Biochem.* 25, 723–731. doi: 10.1016/0022-4731(86)90301-8
- de Quervain, D. J., Henke, K., Aerni, A., Treyer, V., McGaugh, J. L., Berthold, T., et al. (2003). Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1296–1302. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02542.x
- de Quervain, D. J., Roozendaal, B., and McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787–790. doi: 10.1038/29542
- Dorey, R., Piérard, C., Chauveau, F., David, V., and Béracochéa, D. (2012). Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37, 2870–2880. doi: 10.1038/npp.2012.170
- Dorey, R., Piérard, C., Shinkaruk, S., Tronche, C., Chauveau, F., Baudonnat, M., et al. (2011). Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology* 36, 2639–2649. doi: 10.1038/npp.2011.152

- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52, 513–556.
- Fortin, N. J., Agster, K. L., and Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat. Neurosci.* 5, 458–462. doi: 10.1038/nn834
- Frankland, P. W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 119–130. doi: 10.1038/nrn1607
- Gilbert, P. E., and Kesner, R. P. (2004). Memory for objects and their locations: the role of the hippocampus in retention of object-place associations. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 39–45. doi: 10.1016/S1074-7427(03)00069-8
- Godsil, B. P., Kiss, J. P., Spedding, M., and Jay, T. (2013). The hippocampo-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23, 1165–1181. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.10.018
- Hannesson, D. K., Vacca, G., Howland, J. G., and Phillips, A. G. (2004). Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behav. Brain Res.* 153, 273–285. doi: 10.1016/j.bbr.2003.12.004
- Jackson, P. A., Kesner, R. P., and Amann, K. (1998). Memory for duration: role of hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 328–348. doi: 10.1006/nlme.1998.3859
- Jay, T. M., Rocher, C., Hotte, M., Naudon, L., Gurden, H., and Spedding, M. (2004). Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox. Res.* 6, 233–244. doi: 10.1007/BF03033225
- Joels, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M. S., and Krugers, H. J. (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn. Sci.* 10, 152–158. doi: 10.1016/j.tics.2006.02.002
- Kesner, R. P., Gilbert, P. E., and Barua, L. A. (2002). The role of the hippocampus in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Behav. Neurosci.* 116, 286–290. doi: 10.1037/0735-7044.116.2.286
- Kesner, R. P., and Hopkins, R. O. (2006). Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biol. Psychol.* 73, 3–18. doi: 10.1016/j.biopsycho.2006.01.004
- Lisman, J. E., Talamini, L. M., and Raffone, A. (2005). Recall of memory sequences by interaction of the dentate and CA3: a revised model of the phase precession. *Neural Netw.* 18, 1191–1201. doi: 10.1016/j.neunet.2005.08.008
- Maroun, M., and Richter-Levin, G. (2003). Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway *in vivo*. *J. Neurosci.* 23, 4406–4409.
- McEwen, B. S., and Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 205–216. doi: 10.1016/0959-4388(95)80028-X
- McGaugh, J. L., and Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 205–210. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00306-9
- Minni, A. M., Dorey, R., Piérard, C., Dominguez, G., Helbling, J. C., Foury, A., et al. (2012). Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain: impact on memory retrieval. *Endocrinology.* 153, 4766–4774. doi: 10.1210/en.2012-1485
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., and Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887–897. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00105-2
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Takeda, S., Aburada, M., and Tabira, T. (2004). Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J. Neuroscience* 24, 5492–5499. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0086-04.2004
- Moisan, M. P., Minni, A. M., Dominguez, G., Helbling, J. C., Foury, A., Henkous, N., et al. (2014). Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. *Steroids* 81, 109–115. doi: 10.1016/j.steroids.2013.10.013
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edn.* San Diego, CA Academic Press.
- Reul, J. M., and de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505–2511. doi: 10.1210/endo-117-6-2505
- Roozendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 578–595. doi: 10.1006/nlme.2002.4080
- Roozendaal, B., Griffith, Q. K., Buranday, J., De Quervain, D. J., and McGaugh, J. L. (2003). The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1328–1333. doi: 10.1073/pnas.0337480100
- Roozendaal, B., Hahn, E. L., Nathan, S. V., de Quervain, D. J., and McGaugh, J. L. (2004a). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 24, 8161–8169. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2574-04.2004
- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S., Hagewood, R., Malvaez, M., Stefanko, D. P., et al. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J. Neurosci.* 30, 5037–5046. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5717-09.2010
- Roozendaal, B., McReynolds, J. R., and McGaugh, J. L. (2004b). The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairments. *J. Neurosci.* 24, 1385–1392. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4664-03.2004
- Roozendaal, B., Phillips, R. G., Power, A. E., Brooke, S. M., Sapolsky, R. M., and McGaugh, J. L. (2001). Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat. Neurosci.* 4, 1169–1171. doi: 10.1038/nn766
- Sandi, C., Woodson, J. C., Haynes, V. F., Park, C. R., Touyarot, K., Lopez-Fernandez, M. A., et al. (2005). Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* 57, 856–864. doi: 10.1016/j.biopsycho.2004.12.034
- Segal, M., Richter-Levin, G., and Maggio, N. (2010). Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus* 12, 1332–1338. doi: 10.1002/hipo.20751
- Tronche, C., Piérard, C., Coutan, M., Chauveau, F., Liscia, P., and Béracochéa, D. (2010). Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 343–351. doi: 10.1016/j.nlm.2009.11.009
- Vandesquille, M., Baudonnat, M., Decorte, L., Louis, C., Lestage, P., and Béracochéa, D. (2013). Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol. Aging* 34, 1599–1609. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.006
- Van Eekelen, J. A., Jiang, W., De Kloet, E. R., and Bohn, M. C. (1988). Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 21, 88–94. doi: 10.1002/jnr.490210113
- Vouimba, R. M., Yaniv, D., Diamond, D., and Richter-Levin, G. (2004). Effects of inescapable stress on LTP in the amygdala versus the dentate gyrus of freely behaving rats. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1887–1894. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03294.x
- Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Feng, J., McEwen, B., and Yan, Z. (2009). Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14075–14079. doi: 10.1073/pnas.0906791106

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 14 March 2014; accepted: 18 April 2014; published online: 15 May 2014.

Citation: Dominguez G, Faucher P, Henkous N, Krazem A, Piérard C and Béracochéa D (2014) Stress induced a shift from dorsal hippocampus to prefrontal cortex dependent memory retrieval: role of regional corticosterone. *Front. Behav. Neurosci.* 8:166. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00166

This article was submitted to the journal *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

Copyright © 2014 Dominguez, Faucher, Henkous, Krazem, Piérard and Béracochéa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 10: Rescuing prefrontal cAMP-CREB pathway reverses working memory deficits during withdrawal from prolonged alcohol exposure

Rescuing prefrontal cAMP-CREB pathway reverses working memory deficits during withdrawal from prolonged alcohol exposure

G. Dominguez · M. Dagnas · L. Decorte ·
M. Vandesquille · C. Belzung · D. Béracochéa ·
N. Mons

Received: 24 February 2014 / Accepted: 3 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Both human and animal studies indicate that alcohol withdrawal following chronic alcohol consumption (CAC) impairs many of the cognitive functions which rely on the prefrontal cortex (PFC). A candidate signaling cascade contributing to memory deficits during alcohol withdrawal is the protein kinase A (PKA)/cAMP-responsive element binding (CREB) cascade, although the role of PKA/CREB cascade in behavioral and molecular changes during sustained withdrawal period remains largely unknown. We demonstrated that 1 week (1W) or 6 weeks (6W) withdrawal after 6-month CAC impairs working memory (WM) in a T-maze spontaneous alternation task and reduces phosphorylated CREB (pCREB) in the PFC but not the dorsal CA1 region (dCA1) of the hippocampus compared with CAC and water conditions. In contrast, both CAC-unimpaired and withdrawn-impaired mice exhibited decreased pCREB in dCA1 as well as reduced histone H4 acetylation in PFC and dCA1, compared with water controls. Next, we showed that enhancing CREB activity through rolipram administration prior to testing improved WM performance in withdrawn mice but impaired WM function in water mice. In addition, WM improvement correlates positively with increased pCREB level

selectively in the PFC of withdrawn mice. Results further indicate that direct infusion of the PKA activator (Sp-cAMPS) into the PFC significantly improves or impairs, respectively, WM performance in withdrawn and water animals. In contrast, Sp-cAMPS had no effect on WM when infused into the dCA1. Collectively, these results provide strong support that dysregulation of PKA/CREB-dependent processes in prefrontal neurons is a critical molecular signature underlying cognitive decline during alcohol withdrawal.

Keywords Alcoholism Behavior PKA Histone acetylation Prefrontal cortex Hippocampus

Introduction

The cessation of chronic ethanol consumption is often accompanied by several withdrawal symptoms such as increased anxiety, difficulties of concentration and cognitive deficits (Voltaire-Carlsson et al. 1996; Watanabe et al. 2001). Clinical studies have shown that poorer cognitive performance in alcoholic patients was related to severe withdrawal bouts and heavy alcohol consumption (Errico et al. 2002). In line with these observations, both human and animal studies indicate that alcohol withdrawal following chronic alcohol consumption (CAC) impairs many of the cognitive functions which rely on the prefrontal cortex (PFC) (Moselhy et al. 2001; Pfefferbaum et al. 2001; Chanraud et al. 2010). Alterations of the PFC in ethanol-withdrawn animals produced deficits in spatial working memory (WM), a task that depends on the functional integrity of the PFC and its interaction with the hippocampus (HPC) (Beracochéa et al. 1987; George et al. 2012).

D. Béracochéa and N. Mons contributed equally to this study.

G. Dominguez · M. Dagnas · L. Decorte · M. Vandesquille ·
D. Béracochéa · N. Mons (✉)
Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine,
Nouvelle Université de Bordeaux, CNRS UMR 5287, Talence,
France
e-mail: nicole.mons@u-bordeaux1.fr

G. Dominguez · C. Belzung
U-930 Inserm, Université François Rabelais, Parc Grandmont,
Tours, France

A prime mechanism that could underlie the actions of CAC and alcohol withdrawal on PFC cognitive function is dysregulation of cAMP-dependent events based on animal (Szabo et al. 1988; Dar, 1997; Meng et al. 1998) and clinical studies (Tabakoff and Hoffman 1988). Alterations in cAMP-protein kinase A (PKA) activity and downstream cAMP-responsive element binding (CREB) phosphorylation have been observed in various brain regions during alcohol exposure and its withdrawal (for reviews, (Tabakoff and Hoffman 1988; Moonat et al. 2010). However, the regulation of activated/phosphorylated CREB (pCREB) by alcohol appeared to differ depending on the brain region examined. For example, in contrast to the HPC, ethanol withdrawal but not treatment decreased pCREB levels in cortical structures (Pandey et al. 1999, 2001; Bison and Crews 2003). Furthermore, prefrontal CREB function was affected to a greater extent in ethanol-treated adolescent mice than in adults whereas the opposite was seen in the HPC (Faria et al. 2008; Soares-Simi et al. 2013).

The ability of pCREB to initiate gene transcription is achieved via the recruitment of a coactivator which has intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity and can acetylate histones at promoters, resulting in chromatin relaxation and thus enabling gene expression (Chrivia et al. 1993). Histone acetylation has been implicated in activity-dependent gene expression in the HPC (for reviews, (Day and Sweatt 2011; Peixoto and Abel 2013) and the PFC (Bredy et al. 2007; Stafford et al. 2012; Sui et al. 2012; Wang et al. 2012). Reduced HAT activity and histone acetylation patterns in cortical and hippocampal structures have been shown to correlate with persistently altered behavior during withdrawal after CAC in rats (Pascual et al. 2011). Others studies suggested a role for histone acetylation in the development of anxiety-like behaviors and deficits in activity-regulated genes during abstinence (Pandey et al. 2008; Mizuo et al. 2012), as they were abolished after blockade of histone deacetylase (HDAC) activity (Arora et al. 2013; Moonat et al. 2013; You et al. 2014).

However, despite the aforementioned observations that support critical roles for CREB and histone acetylation in alcohol withdrawal-mediated memory deficits, the vast majority of these studies have focused on elucidating behavioral and molecular changes associated with short-term withdrawal periods but not of sustained withdrawal periods. In addition, it has not been directly tested whether WM deficits during alcohol withdrawal are potentially reversible through treatments that activate cAMP-PKA-CREB cascade in the PFC and/or the HPC. To address these questions, we exposed mice to a 6-month CAC period and assessed the effects of 1 week (1W) or 6 weeks (6W) withdrawal on WM and levels of pCREB and histone acetylation in these structures. We then examined the behavioral and molecular consequences of PKA activation,

via systemic phosphodiesterase-IV inhibition by rolipram, in water and withdrawn mice. Finally, to identify specific contribution of PFC and HPC function, we studied whether direct infusion of PKA activator Sp-cAMPS into the PFC or the CA1 region of the dorsal HPC (dCA1) differentially influences WM performance in withdrawn mice.

Experimental procedures

Animals

Male C57/BL6 mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France) at 6 weeks of age. Upon arrival, they were group housed (20 mice) in standard laboratory cages until they were 10 months old. They were maintained in a temperature-controlled colony room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) under a 12:12 light–dark cycle and given ad lib access to food and water or alcohol. Food pellets (Pietrement, France) were enriched with vitamin supplement to avoid nutritional disturbances. Two weeks before the experiments, the mice were housed individually and were daily handled (2 min/day) for 5 days before training. All experimental procedures were carried out during the light phase of the cycle. The experimental protocols were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and approved by a local bioethical committee (N°A5012089).

Alcohol administration

The procedure has been described elsewhere (Celerier et al. 2000). At 4-month-old, mice were given as their sole source of liquid increasing concentration of ethanol solution (V/V) (Prochilab) as follows: 1st week, 4 %; 2nd week, 8 and 12 % for six consecutive months. At the end of this period, alcohol mice ($n = 118$) were randomly assigned to one of the two withdrawal conditions, under which ethanol was progressively replaced by water only at 1 week ($n = 58$) or 6 weeks ($n = 60$) before behavioral testing as follows: 8 % v/v for 3 days followed by 4 % v/v for 3 days, then water. The remaining alcohol mice ($n = 16$) have no restriction to alcohol access. Alcohol and withdrawn mice were compared to a water group constituted by mice having drunk water only ($n = 71$). Blood alcohol concentration (BAC) was determined using an EnzyChrom™ Ethanol Assay Kit (ECET-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

Working memory task

The mice were trained on a sequential alternation task over a series of successive trials run in a T-maze as previously

described (Beracochea et al. 1987; Pierard et al. 2006; Vandesquille et al. 2013). Indeed, to alternate over a series from trial to trial, animals have both to remember at a given N trial the choice made at the $N - 1$ trial, and to reset the interfering information (trials $N - 2$, $N - 3$,...), which is a main aspect of WM (Kesner 2005).

Training session

Animals were initially habituated to the T-maze and allocentric cues during two 10 min-free exploration sessions on two successive days. The mice were then subjected to a training phase [seven successive trials separated by 30-s inter-trial interval (ITI)] to familiarize them with the experimental procedure (opening and closing of doors and confinement into the arms). At the beginning of each trial, the mouse was placed in the start box for 30-s ITI delay. Then, the door was opened and the mouse was allowed to enter one of the goal arms, the door to that arm was closed, and the choice was recorded. After a 30-s confinement period into the chosen arm, the mouse was removed and placed back in the start box for a 2nd trial, identical to the first one. To avoid olfactory cues in the apparatus, visible traces of urine and feces were washed with water.

Test session

Mice were submitted 24 h later to same procedure but the ITI delay was increased to 90 s. An alternation response was considered each time the subject entered the arm opposite to the one visited on the immediately previous trial. Alternation rate was calculated taking into account the seven successive trials, and expressed in percentage relative to the maximal alternation rate of 100 % (obtained when the subject never returned into the same arm over two consecutive trials). The chosen arm and the time that elapsed between opening the door and the arrival to the end of the chosen arm were registered, allowing calculation of the mean choice latency. Following a 30-s confinement period in the chosen arm, the animal was removed and placed in the start box for a new trial. To dissociate memory deficit from an eventual progressive loss of motivation to alternate over the series, an 8th trial was added which was separated by a shorter ITI (5 s) from the 7th trial.

Immunohistochemistry

All mice were deeply anesthetized (Pentobarbital[®], 40 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 4 % paraformaldehyde fixative. Coronal sections (50 μ m) were taken using a vibratome (Leica) and processed for immunohistochemistry as described previously (Dagnas et al. 2013).

The antibodies for phospho(ser133)CREB and acetylated histones H3 (lys9) and H4 (lys5,8,12,16) (Upstate Biotechnology, Lake placid, NY) were used. After washing with Tris buffer (0.1 M), the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Jackson Immunoresearch) followed by an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). The peroxidase reaction was visualized using diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. Digital images of each side of the dorsal HPC (from bregma: -1.70 to -2.30 mm), ventral HPC (from bregma: from -2.80 to -3.08 mm) and PFC (from bregma: $+1.98$ to $+1.50$ mm), as defined by the mouse stereotaxic brain atlas of Franklin and Paxinos (1997), were captured at 10 \times magnification using an Olympus (BX50) and an imaging analysis system (Biocom Visiolab 2000, V4.50). At all stages, the experimenter was blind to the experimental groups. For each animal, three to four consecutive sections (every first section in each set of four 50 μ m-sections) were examined bilaterally and the number of positive nuclei/mm² was averaged to produce a mean.

Experimental designs

Experiment 1: effects of alcohol and alcohol withdrawal on WM-related changes in pCREB and histone acetylation in the PFC and the HPC

Experimental design is described in Fig. 1a. Cohorts of 10-month-old mice from the water ($n = 11$), alcohol ($n = 10$) and withdrawal 1W ($n = 9$) and 6W ($n = 10$) groups together with a 4-month-old cohort of mice ($n = 7$) were trained on a WM task. The 10-month-old mice were killed for immunohistochemistry 30 min after the beginning of the test session. An additional control naive group was sacrificed directly from their home cage (water: $n = 10$; alcohol: $n = 6$; withdrawal 1W: $n = 8$ and 6W: $n = 7$).

Experiment 2: effects of systemic PKA activation on WM performance and levels of pCREB and histone acetylation in water and withdrawn mice

Rolipram (0.1 mg/kg/body weight; Sigma-Aldrich) was dissolved in 1 % DMSO (Zhang et al. 2000; Reneerkens et al. 2009). Thirty minutes before testing, water and withdrawal mice were randomly given a single i.p. injection of rolipram (water: $n = 10$; 1W: $n = 8$; 6W: $n = 9$) or vehicle (water: $n = 9$; 1W: $n = 8$; 6W: $n = 8$). All mice were killed 30 min after the beginning of WM testing for immunohistochemistry. Naive controls were treated

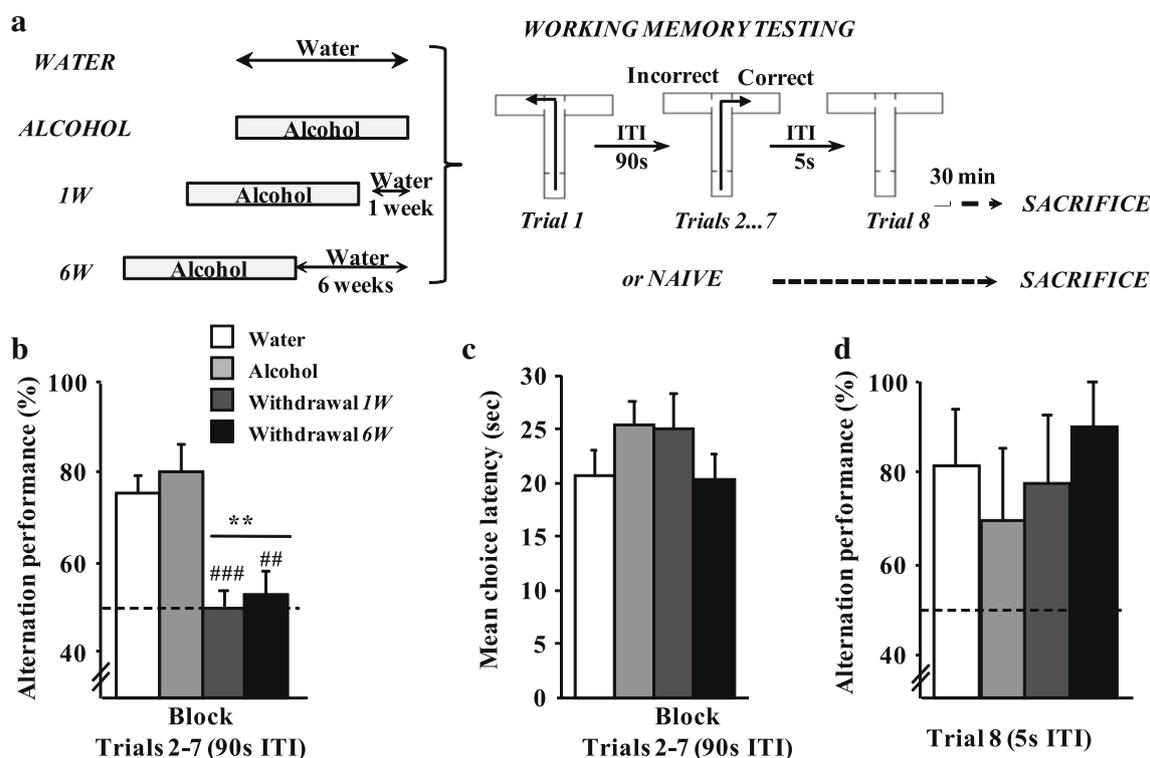


Fig. 1 Alcohol withdrawal impairs WM in a long-delay alternation T-maze task. **a** Experimental design of the working memory testing session, in which mice from the water ($n = 11$), alcohol ($n = 10$), and withdrawal 1W ($n = 9$) and 6W ($n = 10$) groups were given seven successive trials separated by a 90-s inter-trial interval (ITI) followed by an additional trial with a 5-s ITI. **b** Alternation performance expressed as mean + SEM percentage of correct

responses and **c** choice latencies expressed as mean time (in sec) to make arm choice were calculated during Trials 2–7 for each experimental condition. **d** Alternation performance on Trial 8th with 5-s ITI. Dashed lines for **b** and **d** represent chance level. Bars represent mean + SEM. $**p < 0.01$ vs. water. $###p < 0.01$ and $####p < 0.001$ vs. alcohol

identically except that they were sacrificed directly from their home cage for every conditions (vehicle: water: $n = 6$; 1W: $n = 4$; 6W: $n = 4$ and rolipram: water: $n = 6$; 1W: $n = 4$; 6W: $n = 5$).

Experiment 3: effect of bilateral intra-PFC or intra-dCA1, infusion of Sp-cAMPS on WM in withdrawn mice

Surgical procedure

Water and withdrawn mice were anesthetized with ketamine (100 mg/Kg; body weight, i.p.) and xylazine (10 mg/kg; body weight, i.p.) (Bayer, Wuppertal, Germany) and implanted bilaterally with guide cannulae (26 gauge, 8-mm length) above the PFC (anteroposterior +1.9 mm, lateral ± 0.3 mm and depth 1.2 mm; relative to bregma) and the dCA1 (anteroposterior -2 mm, mediolateral ± 1.4 mm, dorsoventral -0.9 mm; relative to bregma). Mice were allowed to recover for 2 weeks before WM testing. Water ($n = 10$) and withdrawal 1W and 6W ($n = 9$ for each) mice were infused 15 min before WM testing with the

PKA activator Sp-cAMPS (Punch et al. 1997) (Sp-diastereomer of cAMP; Tocris Bioscience) into the PFC (0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 2.5 min) or the dCA1 (0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ for 5 min). The dose of Sp-cAMPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was based on preliminary experiments (data not shown). Other mice (water: $n = 9$; 1W and 6W: $n = 8$ for each) received artificial cerebrospinal fluid (ACSF; vehicle) infusions. For each mouse, the same injection procedure was replicated 72 h later but the locus of injection was alternated, i.e. mice that had been infused into the PFC at the earlier time point were injected into the dCA1 and vice versa. The cannulae were left in place for an additional 1 min before removal to allow for diffusion. After WM testing, animals were sacrificed and cannulae placements were verified on 30- μm coronal sections stained with thionine blue coloration and visualized under an optical microscope.

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed using three-way factorial analyses of variance (ANOVAs) to highlight between-groups differences and to determine the effect of treatment,

when adequate, with post hoc comparisons. Comparisons of retrieval performances with chances level were calculated with one-sample *t* test (with hypothesized mean = -chances level = 50 % for correct responses). Statistical analyses were performed using ANOVAs (StatView® statistical software) followed by appropriate post hoc tests set to reliability level of $p < 0.05$. For correlation analyses, the Spearman's correlation coefficient, *R*, was determined and a probability level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

Experiment 1: alcohol withdrawal was associated with impaired WM and reduced CREB phosphorylation and histone H4 acetylation in the PFC

Blood alcohol levels and cell death

In the present study, we subjected a cohort of 4-month-old mice to a regimen of 6-month CAC period and assessed behavioral and molecular changes induced by 1W or 6W withdrawal (Fig. 1a). When blood samples were taken just before the beginning of the memory test, very low levels of ethanol were detected in the blood of alcohol-treated mice (CAC: 0.58 ± 0.17 mg/dl; water: 0 ± 0 mg/dl). Moreover, upon thionin staining of the PFC, a weak neuronal cell death occurred in the alcohol ($-5.75 \% \pm 3.09$) and withdrawal 1W mice ($-8.52 \% \pm 3.49$) and no apparent neuronal loss was found in withdrawal 6W mice ($-0.89 \% \pm 1.59$), compared with water controls. The results are in agreement with our previous observations using the same alcoholization procedure in Balb/c mice (Lescaudron et al. 1984; Beracochea et al. 1987).

Withdrawal effects on WM performance

Both water and alcohol animals alternated significantly above the chance level of 50 % (water: $75.76 \pm 4.12 \%$; $t(10) = 6.25$; $p < 0.001$ and alcohol: $80.0 \pm 6.48 \%$; $t(9) = 4.63$; $p = 0.0012$; Fig. 1b). The two groups did not differ from 4-month-old mice ($69.04 \pm 5.66 \%$; $t(7) = 3.01$; $p = 0.018$; data not shown). One-way ANOVA, group effect: $F(2,25) = 0.88$; $p = 0.42$), indicating that 10-month-old water and alcohol mice showed no WM deficits. By contrast, mice from withdrawal 1W and 6W groups responded at chance (1W: $50.0 \pm 3.93 \%$; $p = \text{NS}$ and 6W: $53.33 \pm 4.84 \%$, $p = \text{NS}$). Analysis of variance yielded a significant between-groups difference ($F(3,36) = 9.34$; $p < 0.001$), with both withdrawal groups exhibiting lower alternation rates compared with water

(both $p < 0.01$) and alcohol groups (1W: $p < 0.001$; 6W: $p < 0.01$). Further analyses per block of trials (Block A, trials 2–4 and Block B, trials 5–7) revealed a significant Block effect ($F(1,36) = 4.64$; $p = 0.037$, data not shown). Indeed, whereas no significant between-group differences were observed at Block A ($F(1,36) = 1.02$; $p = \text{NS}$), the Block B resulted in a significant impairment of alternation rates in the withdrawn groups (group effect ($F(3,36) = 12.24$; $p < 0.001$); vs. water and alcohol: $p < 0.001$ in all comparisons).

The WM deficits in withdrawn mice did not result from motivational or other factors unrelated to WM because the mean choice latency did not differ among the groups, whatever the factor considered ($p > 0.05$ in all comparisons; Fig. 1c). Moreover, all groups exhibited similar short-term alternation rates under 5-sec ITI delay condition ($F(3,36) = 0.40$; NS; Fig. 1d).

Withdrawal effects on CREB phosphorylation

We next determined the levels of pCREB in the PFC and the HPC (dCA1 and vCA1) of mice from the four experimental groups using immunohistochemistry. Animals were sacrificed 30 min after the end of the WM testing session. The results were expressed as percentage changes in pCREB levels relative to naive controls sacrificed just before testing (Fig. 2).

In the PFC, pCREB levels were significantly increased after WM testing in the water and alcohol groups, but not the withdrawal groups, compared with respective naive controls (Fig. 2a, e). This observation was supported by a one-way ANOVA which yielded a significant between-group difference ($F(3,36) = 5.79$; $p = 0.0024$). Post hoc comparisons indicated significant differences between both water and alcohol groups and withdrawal 6W mice (both $p < 0.01$) as well as between water and withdrawal 1W groups ($p < 0.05$). Figure 2b shows representative pCREB immunoreactivity in the PFC for each of the experimental groups under naive (top) and trained (bottom) conditions.

In the dCA1, differential CREB activation was also observed after WM testing as a function of the group examined (Fig. 2c, e; ANOVA, $F(3,36) = 4.658$; $p < 0.0075$). Specifically, the water group displayed higher pCREB level after WM testing than respective naive controls ($p < 0.001$), whereas no training effects were observed in other groups (all $p > 0.1$). Levels of pCREB in the water group significantly differed from those of the withdrawal groups (1W and 6W: both $p < 0.001$), which otherwise did not differ from each other.

In the vCA1, there was no effect of WM testing on pCREB levels, whichever experimental group was considered ($F(3,36) = 1.04$; $p = 0.38$; Fig. 2d, e).

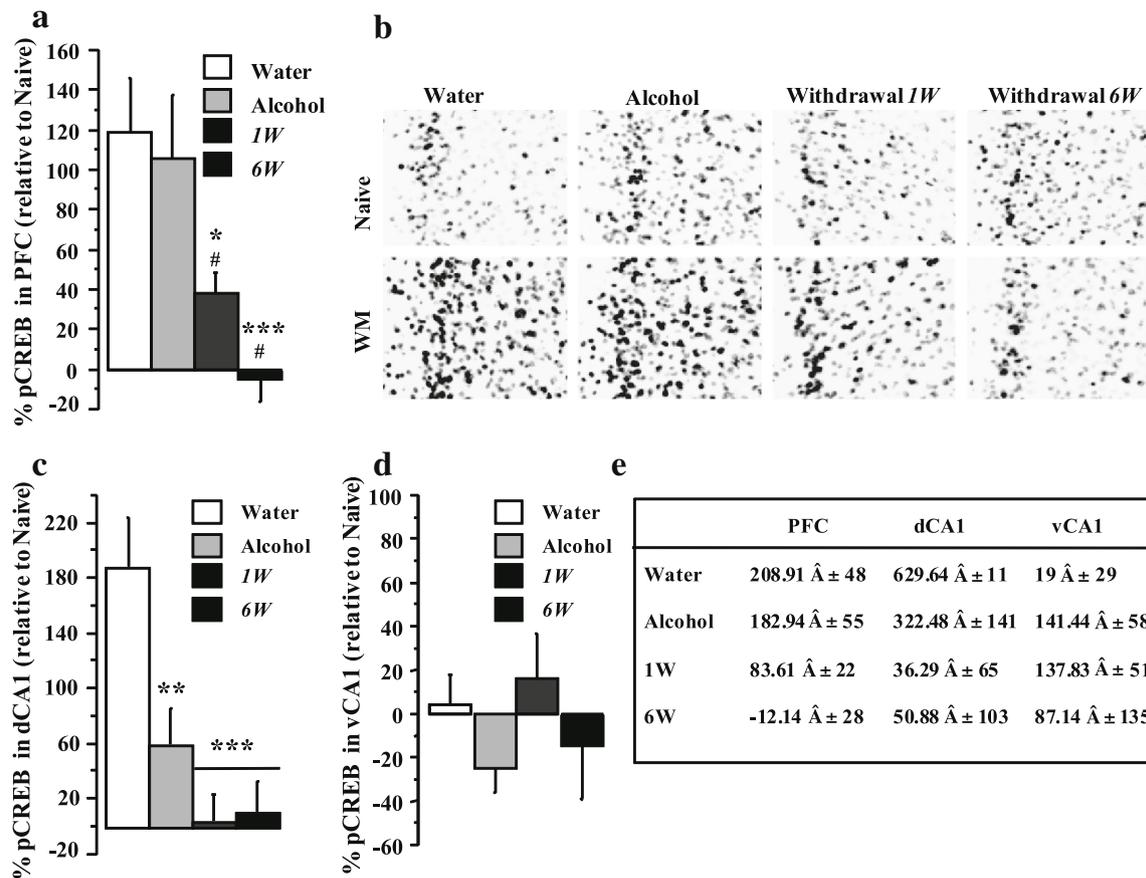


Fig. 2 Effects of alcohol withdrawal on CREB phosphorylation in the PFC and the HPC. **a** Withdrawal 1W and 6W mice showed significantly lower pCREB levels in the PFC than water and alcohol mice after WM testing. **b** Representative 50- μ m coronal sections of the PFC that show pCREB immunoreactivities in Naive controls (*top*) and in mice sacrificed 30 min after the beginning of WM testing (*bottom*) for the four experimental groups. **c** In the dCA1, water mice exhibited higher pCREB levels than both alcohol and withdrawal

mice after WM testing. **d** There was no between-group difference in pCREB levels in the vCA1. The data represent mean \pm SEM percentage of changes after WM testing relative to naive controls. **e** Summary of the mean number of positive pCREB nuclei per mm² found in the PFC, dCA1 and vCA1 of the four experimental groups after WM testing. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. water. # p < 0.05 vs. alcohol

Effects of withdrawal on histone acetylation

We determined whether alcohol withdrawal after CAC produces changes in histone acetylation status in the PFC and the dHPC.

After WM testing, only the water group exhibited significant WM-related increase in Ac-H4 in the PFC (Fig. 3a left; ANOVA, significant between-group differences, $F_{(3,36)} = 6.78$; $p < 0.0001$) and dCA1 (Fig. 3b left; ANOVA, significant between-group differences, $F_{(3,36)} = 6.15$; $p < 0.01$). Post hoc analyses confirmed significantly higher Ac-H4 levels in the water vs. alcohol or withdrawn mice in the PFC (alcohol: $p < 0.01$; 1 and 6W: both $p < 0.0001$) and the dCA1 (alcohol: $p < 0.05$; 1 and 6W: both $p < 0.01$). In contrast, no between-group differences were found for Ac-H4 in the vCA1 (all $F > 1$; NS; data not shown).

No WM-related changes were detected for Ac-H3, irrespective of region and condition analyzed (Fig. 3, right).

Experiment 2: rolipram alleviates WM deficits and restores levels of pCREB and Ac-H4 in withdrawn mice

We next compared the effects of increasing CREB function on WM performance in water and withdrawn mice by administering a single, i.p. injection of rolipram or vehicle 30 min before testing (Fig. 4a). As expected, performance during the test session was above chance level in the vehicle-water group (74.07 ± 4.04 %; $t(8) = 5.96$; $p < 0.001$) but not in vehicle-withdrawal groups (1W: 58.33 ± 5.45 %; $t(7) = 1.53$; $p = 0.17$; 6W: 54.17 ± 2.73 %; $t(7) = 1.53$; $p = 0.17$) (Fig. 4b). ANOVAs

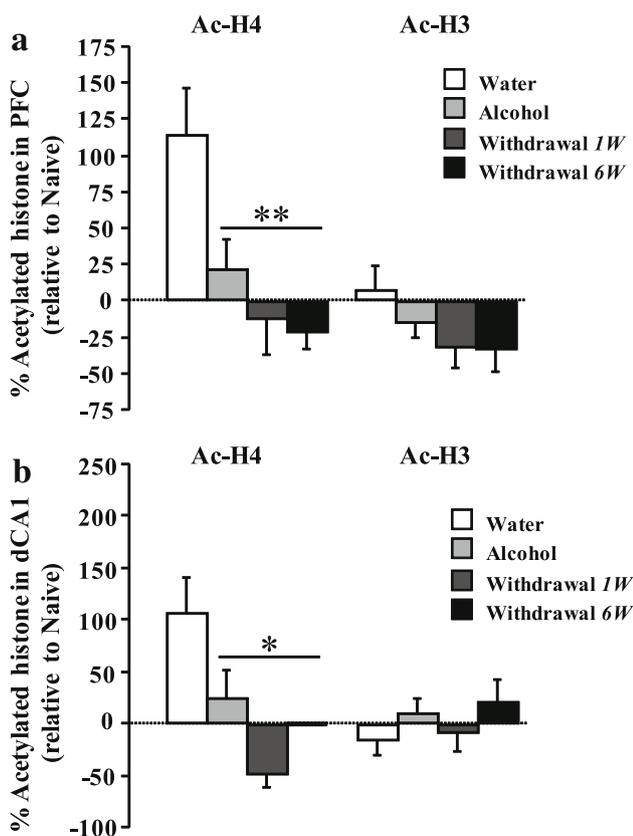


Fig. 3 Effects of alcohol withdrawal on histone acetylation in the PFC and the HPC. **a, b** After WM testing, the water mice showed greater levels of Ac-H4 than alcohol and withdrawal 1W and 6W mice in the PFC (**a left**) and the dCA1 (**b left**). In contrast, no changes in Ac-H3 were observed in the PFC and dCA1 (**a, b right**) in any of the experimental groups. The data represent mean \pm SEM percentage of changes in Ac-H4 or Ac-H3 in mice sacrificed 30 min after the beginning of WM testing relative to respective naive controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. water

confirmed a significant between-groups difference ($F_{(2,22)} = 6.42$; $p = 0.006$), alternation rates being significantly greater in water mice compared with withdrawn mice ($p \leq 0.01$ in all comparisons). Systemic administration of rolipram improved performance in both withdrawal groups (1W: $75.0 \pm 5.45\%$; $t(7) = 4.58$; $p = 0.0025$; 6W: $79.63 \pm 3.70\%$; $t(8) = 8.0$; $p < 0.001$). Both rolipram-withdrawn groups showed much higher alternation rates than respective vehicle groups (1W: $t(14) = 2.16$; $p < 0.05$ and 6W: $t(15) = 5.41$; $p < 0.001$). In contrast, rolipram-water mice responded at chance ($48.33 \pm 3.89\%$; $t(9) = -0.43$; NS). One-way ANOVA confirmed a significant between-group effect ($F_{(2,24)} = 16.22$; $p < 0.0001$) with rolipram-water mice performing significantly worse than rolipram-withdrawn mice ($p < 0.001$ in both comparisons).

No such effects were observed on the 8th trial of the test session (data not shown), indicating that withdrawal and/or treatment did not affect motivation to alternate during the testing session.

To test the region-specific effects of i.p. rolipram injection, we measured levels of pCREB and Ac-H4 in the PFC (Fig. 4c) and the dCA1 (Fig. 4d) of vehicle- and rolipram-treated groups killed 30 min after the beginning of the test session.

The ANOVAs for both pCREB and Ac-H4 data in the PFC revealed significant between-groups differences (pCREB: $F_{(2,46)} = 10.63$; $p < 0.001$; Ac-H4: $F_{(2,46)} = 8.75$; $p < 0.001$) as well as a significant “treatment” effect (pCREB: $F_{(1,46)} = 20.52$; $p < 0.001$; Ac-H4: $F_{(1,46)} = 15.20$; $p < 0.001$) without significant between-factors interaction (both $F_{(2,46)} < 1$; both p : NS). Specifically, withdrawn mice exhibited significantly reduced pCREB and Ac-H4 levels relative to water mice, regardless of whether they were treated with vehicle (pCREB: all $p < 0.05$ except $p = 0.078$ for Ac-H4 in withdrawal 1W) or rolipram (all $p < 0.01$ except $p < 0.05$ for pCREB in withdrawal 6W). However, the factor “treatment” indicated significantly higher pCREB and Ac-H4 levels in rolipram vs. vehicle groups (all $p < 0.05$ except for Ac-H4 in withdrawal 1W: $p = 0.06$). In the dCA1 (Fig. 4d), there was a significant between-group difference for pCREB ($F_{(2,46)} = 13.79$; $p < 0.001$) and Ac-H4: ($F_{(2,46)} = 8.88$; $p < 0.001$) but no “treatment” or “factors interaction” effects (all $F < 1$; NS). Overall, these results suggest that improved or impaired WM performance in rolipram-treated mice arose from changes in pCREB and Ac-H4 specifically in the PFC.

Correlation analyses were applied to confirm relationships between individual WM performance and prefrontal pCREB levels in water and withdrawal groups. Overall, when vehicle- and rolipram-treated mice were pooled together, individual percent alternation rates correlated positively with pCREB levels in withdrawn mice ($R = 0.57$; $p < 0.001$) whereas a negative, non-significant, correlation was found between behavioral performance and pCREB in water mice ($R = -0.42$; $p > 0.5$; Fig. 4e). When each withdrawal group was considered separately, we found a strong positive correlation for withdrawal 6W mice ($R = 0.82$; $p < 0.001$; Fig. 4f), but not for 1W mice ($R = 0.2$; $p > 0.5$). In withdrawal 6W mice, there were also positive correlations between individual performance vs. Ac-H4 in the PFC ($R = 0.673$; $p < 0.01$) or between pCREB vs. Ac-H4 in the PFC ($R = 0.6$; $p = 0.01$). No such correlations were found in dCA1 region, providing more support for the hypothesis that prefrontal CREB plays a key role in alcohol withdrawal-related memory deficits.

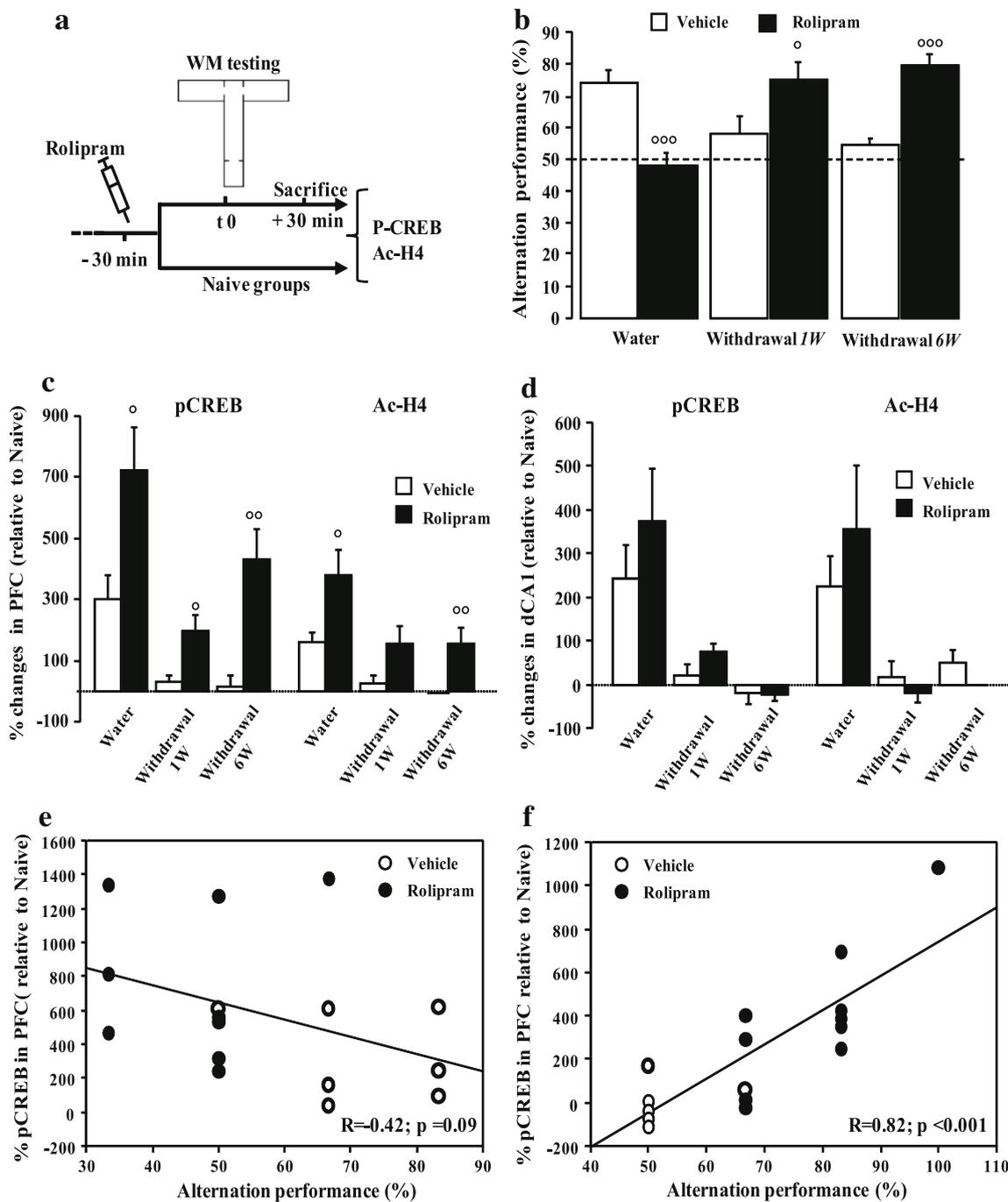


Fig. 4 Systemic administration of rolipram reverses working memory impairments and rescues the deficits in pCREB and Ac-H4 in the PFC during alcohol withdrawal. **a** Experimental design. Thirty minutes before WM testing, mice from the water, withdrawal 1W and 6W groups received i.p. injection of rolipram (0.1 mg/kg) or vehicle. They were then submitted to WM testing and sacrificed 30 min later for pCREB and Ac-H4 immunohistochemistry. For comparison, rolipram- and vehicle-injected Naive mice that remained in the home cage were killed for immunohistochemistry. **b** Systemic rolipram had opposite effects on WM in water group (impairment) and withdrawal 1W and 6W groups (improvement). The data represent mean percentage of alternation performance during Trials

2–7 (90-s ITI). **c** Compared with vehicle, rolipram enhanced (water) or rescued to normal level (withdrawal 1W and 6W) pCREB (left) and Ac-H4 (right) immunoreactivities in the PFC of mice subjected to WM testing. **d** rolipram had no effect on pCREB (left) and Ac-H4 (right) immunoreactivities in the dCA1. The data represent mean \pm SEM percentage of changes relative to respective naive controls. **e, f** Correlations between alternation performance and changes in pCREB after WM testing for the water (**e**; $R = -0.42$; $p = 0.09$) and withdrawal 6W (**f**; $R = 0.82$; $p < 0.001$) groups when all vehicle (open circles) and rolipram (black circles) mice were pooled together. $p < 0.05$, ^{oo} $p < 0.01$, ^{ooo} $p < 0.001$ vs. vehicle

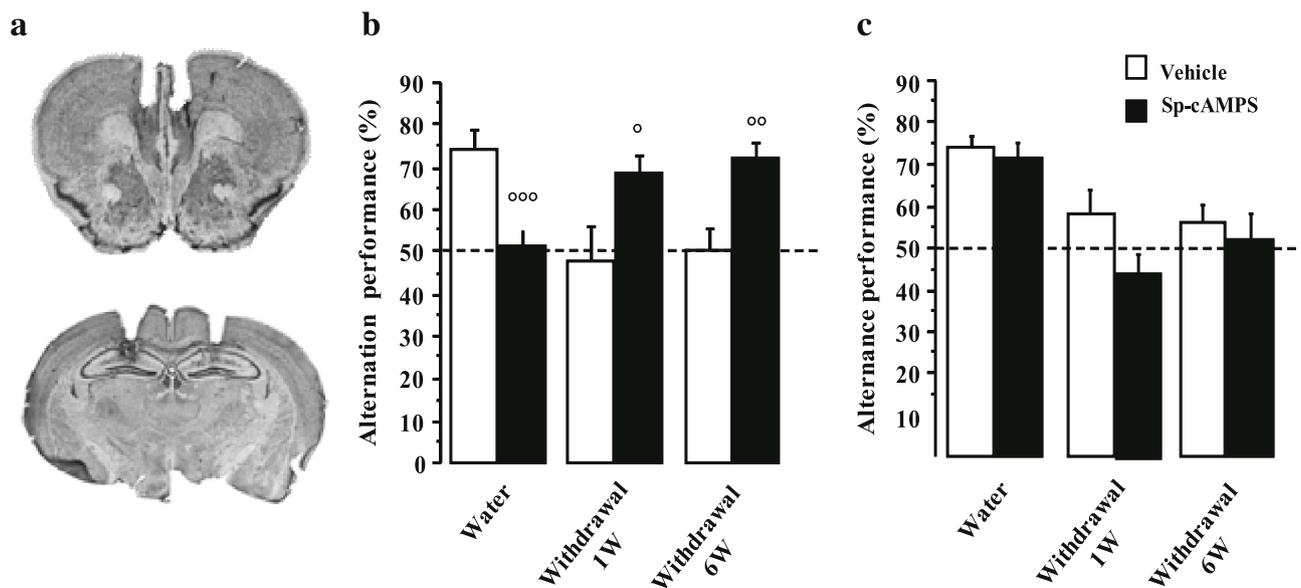


Fig. 5 Acutely increasing cAMP-PKA-CREB in the PFC but not the dCA1 is sufficient to rescue withdrawal-associated WM deficits. Mice from the water, withdrawal 1W and 6W groups received acute, bilateral infusion of vehicle or the selective PKA activator Sp-cAMPS into the PFC (0.25 µg in 0.25 µl) or the dCA1 (0.5 µg in 0.5 µl) 15 min prior to WM testing. **a** Representative views of injection sites in the PFC (*top*) and the dCA1 (*bottom*) showing tracks of guide

cannulae (*arrows*). **b** Compared with vehicle, Sp-cAMPS into the PFC impaired and improved working memory performance in water and withdrawal groups, respectively. **c** Sp-cAMPS into the dCA1 had no effect on working memory, in any of the groups examined. The data represent mean + SEM percentage of alternation performance during Trials 2–7 (90-s inter-trial interval). $p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$, $^{oo}p < 0.001$ vs. vehicle

Experiment 3: direct infusion of Sp-cAMPS into the PFC, but not dCA1, alleviates withdrawal-associated WM deficits

To complement the above findings, we next tested the effects of acutely increasing CREB activity into the PFC or the dCA1 on WM performance in water and withdrawal mice. To that aim, bilateral infusions of Sp-cAMPS or vehicle into either the PFC or dCA1 were performed 15 min before the test session (Fig. 5a). As expected, Fig. 5b shows that, when vehicle was infused into the PFC, water mice exhibited alternation rates that were significantly above chance (74.07 ± 4.90 %; $t(8) = 4.92$; $p = 0.001$) whereas withdrawn animals did not (1W: 47.92 ± 7.99 %; $t(7) = -0.26$; NS; 6W: 50.0 ± 5.45 %; $t(7) = -0.001$; NS). ANOVAs yielded a significant between-groups difference ($F_{(2,22)} = 5.76$; $p < 0.01$), alternation rates being significantly greater in water mice compared with withdrawn mice ($p \leq 0.01$ in all comparisons). In contrast, acute intra-PFC infusion of Sp-cAMPS improved performance in withdrawal groups (1W: 68.52 ± 4.34 %; $t(8) = 4.26$; $p < 0.01$; 72.22 ± 3.93 %; $t(8) = 5.66$; $p < 0.001$) but impaired performance in water group (51.66 ± 2.99 %; $t(9) = 0.55$; NS). This was confirmed by a significant between-group difference ($F_{(2,25)} = 8.82$; $p = 0.0013$), with both Sp-cAMPS-withdrawal groups showing significantly higher percentage of

alternation rates than Sp-cAMPS-water group (vs 1W: $p < 0.01$; vs 6W: $p < 0.001$). Here again, choice latencies did not significantly differ among the groups, whatever the factor considered ($p > 0.5$ in all comparisons; data not shown).

Intra-dCA1 infusion of Sp-cAMPS had no effect on WM performance in water and withdrawal groups (Fig. 5c). Water animals exhibited sequential alternation rates that were above chance level, regardless of whether they received vehicle (74.07 ± 2.93 %; $t(8) = 8.22$; $p < 0.001$) or Sp-cAMPS (71.67 ± 3.56 %; $t(9) = 6.09$; $p < 0.001$) whereas withdrawn mice responded at chance (vehicle 1W: 58.33 ± 5.45 %; $t(7) = 1.53$; NS; 6W: 56.25 ± 4.38 %; $t(7) = 1.43$; NS; Sp-cAMPS 1W: 44.44 ± 4.81 %; $t(8) = -1.15$; NS; 6W: 51.85 ± 6.48 %; $t(8) = 0.29$; NS). Whatever the treatments, performance was higher in water vs. withdrawn mice (all $p < 0.05$). Overall, the findings indicate that acutely enhancing PKA/CREB activity selectively in the PFC (but not the dCA1) is sufficient to rescue withdrawal-associated WM deficits.

Discussion

To sum up our findings, we have shown that alcohol withdrawal produces long-term WM impairments in a T-maze sequential alternation task that are associated with

decreased CREB phosphorylation selectively in the PFC. The behavioral and molecular deficits appeared to be selectively related to alcohol withdrawal since no such changes were observed in CAC mice. In contrast, both CAC-unimpaired and withdrawn-impaired mice exhibited decreased pCREB level in the dCA1 as well as altered histone H4 acetylation in both structures, compared with water controls. Systemic administration of rolipram before WM testing was effective in either enhancing (in water mice) or rescuing to normal levels (in withdrawal mice) pCREB in the PFC, but did not affect the dCA1 region. Importantly, rolipram-induced increase in pCREB level in the PFC had bidirectional effects on spontaneous alternation performance in water (impairment) and withdrawal (improvement) groups. Finally, locally increasing cAMP-PKA activity into the PFC, but not dCA1, was sufficient to rescue withdrawal-related WM deficits, supporting a role for deregulated PKA/CREB signaling in mediating prefrontal cognitive declines during alcohol withdrawal.

Our data indicated that both short (1 week) or prolonged (6 weeks) alcohol withdrawal periods significantly impair WM performance (mainly on the three last trials) in the T-maze spontaneous alternation task whereas six months of alcohol consumption did not. The data confirmed previous results obtained in Balb/c strain mice indicating that WM deficits are observed after 12 months, but not 6 months, of CAC (Beracochea et al. 1987). The low alternation rates observed in withdrawn mice were not attributable to decreased motivation or capacity to alternate during trial series, as performances were not compromised when the ITI was shortened from 90 s to 5 s. Thus, the withdrawal-associated WM deficits resulted in increased vulnerability to delay-dependent proactive interference over a series. Both human and rodent studies have reported enhanced anxiety-like behaviors in various tests during ethanol withdrawal (for review, Kliethermes 2005). In our experimental conditions, increased anxiety in an elevated plus maze and in exploratory patterns in a 9-hole board was observed in withdrawn 1W mice that did not persist in withdrawn 6W mice (data not shown). Thus, the prolonged WM deficits seen in both withdrawn 1W and 6W mice cannot be the result of withdrawal-induced anxiety-like behavior but must be considered as particularly long-lasting impairments caused by CAC. Previous studies also demonstrated that alcohol withdrawal consistently potentiates memory deficits in spatial and non-spatial tasks induced by several weeks/months of CAC (Melis et al. 1996; Lukoyanov et al. 1999; Farr et al. 2005). Data from rodent studies on adaptive changes after prolonged ethanol exposure have suggested that cognitive deficits and development of neuronal damage during alcohol withdrawal are mediated, at least in part, through enhanced glutamatergic neurotransmission and excessive Ca^{2+}

influx. Such imbalance particularly within the cortex and the HPC are believed to underlie withdrawal-induced seizure, neuronal cell loss and cognitive deficits in rodents and humans (For reviews, Ward et al. 2009; Prendergast and Mulholland 2012). Although we did not find any evidence of obvious neuronal cell loss in the PFC of withdrawn mice, considering the importance of glutamate in regulating PFC function and connectivity (Blot et al. 2013) it is conceivable that enhanced prefrontal glutamatergic activity during alcohol withdrawal contributes to impaired WM performance.

In withdrawn animals, WM impairments were associated with reduced pCREB levels in PFC and dCA1 regions whereas the CAC (unimpaired) mice showed reduced pCREB levels in the dCA1 only. Thus, the current results suggest that altered CREB phosphorylation specifically in the PFC is involved in the withdrawal-associated WM deficits. In this respect, decreased CREB phosphorylation and reduced expression of CREB target genes have been observed in cortical structures of ethanol-withdrawn rats (Pandey et al. 1999; 2001). Both alcohol and withdrawal groups displayed reduced dCA1 CREB phosphorylation compared with water controls, suggesting that altered hippocampal CREB function may contribute to behavioral deficits commonly observed during alcohol exposure and “*early abstinence*”. Indeed, anatomical and neurochemical changes occurring in the HPC during alcohol exposure are considered as major mechanism that underlie hippocampus-dependent spatial/contextual memory loss [for review, (Matthews and Morrow 2000)]. Moreover, repeated ethanol produced greater decreases in pCREB, CREB-DNA binding activity and CREB target gene expression in the HPC compared with the PFC (Faria et al. 2008, Soares-Simi et al. 2013). Importantly, our results indicated that CAC and its withdrawal affected specifically pCREB in the PFC and the dHPC, as no changes were found in the vCA1 region. These results fit well with current literature assigning a “cognitive” role for the dHPC and a more important implication of the vHPC in emotional behavior (Fanselow and Dong 2010; Segal et al. 2010).

Decreased histone acetylation, resulting from decreased CBP activity but increased HDAC activity, has been reported during withdrawal after chronic ethanol exposure (Pandey et al. 2008; Sakharkar et al. 2012) and these events have been associated with abnormal expression of plasticity/memory-related genes (Pandey et al. 2008; Qiang et al. 2011; Pascual et al. 2012). Here, we found that withdrawal after prolonged alcohol exposure robustly and selectively reduced the learning-related acetylation of H4, but not H3, in the PFC and dCA1, suggesting that altered H4 acetylation could be involved in mediating withdrawal-related WM deficits. Indeed, altered histone H4 acetylation in the dHPC has been implicated in impaired hippocampus-

dependent contextual/spatial memories in mice (Peleg et al. 2010; Dagnas et al. 2013; Dagnas and Mons 2013) and rats (Bousiges et al. 2010; Zeng et al. 2011; Castellano et al. 2012). In our study, however, levels of Ac-H4 were also reduced in the PFC and the dCA1 of alcohol-treated mice. The data suggest that altered H4 acetylation in the PFC and dHPC may be related to adaptive changes that develop with CAC. Indeed, previous studies showed that chronic alcohol exposure leads to widespread changes in brain gene expression both in humans and animal models (Pandey et al. 2008; Qiang et al. 2011; Pascual et al. 2012; Ponomarev et al. 2012), and many of these gene expression changes including genes critical in neural transmission and related brain functions were involved in homeostatic adaptation in multiple regions of the brain that contribute to alcohol dependence (Mayfield et al. 2008; Zhou et al. 2011). Future studies will provide important insight regarding the contribution of epigenetic regulatory changes on gene networks involved in alcohol tolerance and dependence in our CAC model.

In the second experiment, we tested whether withdrawal-associated WM impairments could be rescued by restoration of prefrontal CREB function through i.p. injection of the specific phosphodiesterase-IV inhibitor rolipram prior to testing session. We found that rolipram bidirectionally influenced WM performances in water (*impairment*) and withdrawal (*improvement*) groups. In addition, rolipram was effective in either enhancing (in water mice) or rescuing to normal levels (in withdrawal mice) pCREB in the PFC, but not the dCA1 region. These results strongly suggest that an optimal window of PKA-CREB activation selectively in the PFC is necessary for normal WM function. Consistently, WM impairment or improvement in aged mice also depends on the level (reduction or over-expression) of pCREB in the PFC but not the dCA1 (Vandesquille et al. 2013). In agreement with our observation that rolipram-impaired WM in water mice with intact CREB function, we and others have shown that aberrant and sustained activation of cAMP-PKA signaling can lead to cognitive deficiencies (Belanoff et al. 2002; Ramos et al. 2003; Giralt et al. 2011). For instance, disinhibition of cAMP/PKA signaling exacerbated prefrontal cognitive deficits in aged animals and infusion of drugs that enhance prefrontal CREB activity worsened WM in young-adults (Ramos et al. 2003; Runyan and Dash 2005; Vandesquille et al. 2013). Remarkably, rolipram also reversed the deficits in prefrontal Ac-H4 in withdrawn mice, while having no effect in the dCA1 region. Moreover, the increases in pCREB and Ac-H4 in the PFC correlated positively with enhanced WM performance in rolipram-withdrawal mice, suggesting that CREB and H4 acetylation are parts of the same withdrawal-sensitive signaling cascade which contributes to disruption of PFC functioning. A

mechanism has been proposed in which CBP, when recruited by CREB, modulates both ethanol and cocaine-associated behaviors through increased acetylation of histones and up-regulation of genes such as *c-fos* and *NPY* (Pandey et al. 2008; Malvaez et al. 2011). Future studies will be aimed at examining the changes in CREB target genes attributable to altered H4 acetylation in the PFC and other regions during CAC and alcohol withdrawal.

Using direct intra-PFC or intra-dCA1 infusion of the PKA activator Sp-cAMPS before testing, we confirmed that local PKA activation occurring selectively in the PFC is sufficient to reverse WM deficits in withdrawal mice but impairs WM in water mice. Furthermore, activating hippocampal PKA activity had no effect on WM performance both in withdrawn and water animals. Together, these findings not only demonstrate that alcohol withdrawal after CAC did not affect the PFC and dHPC functioning in the same manner but also strengthened the role of PFC-specific cAMP-PKA-CREB signaling cascade in mediating the observed withdrawal-associated WM impairments.

In conclusion, our data provide direct evidence that WM deficits during alcohol withdrawal correlated with deficiencies in CREB phosphorylation and H4 acetylation specifically in the PFC. The results further revealed that systemic or direct intra-PFC activation of cAMP-PKA pathway, by normalizing the reductions in both pCREB and Ac-H4 in the PFC, improved WM performance during alcohol withdrawal. These findings may have important implications for the development of effective strategies aimed at preventing the deleterious impact of withdrawal on PFC-dependent cognitive function and delayed neurobiological alterations.

Acknowledgments This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and IREB (Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Arora DS, Nimitvilai S, Teppen TL, McElvain MA, Sakharkar AJ, You C, Pandey SC, Brodie MS (2013) Hyposensitivity to gamma-aminobutyric acid in the ventral tegmental area during alcohol withdrawal: reversal by histone deacetylase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 38:1674–1684
- Belanoff JK, Jurik J, Schatzberg LD, DeBattista C, Schatzberg AF (2002) Slowing the progression of cognitive decline in Alzheimer's disease using mifepristone. *J Mol Neurosci* 19:201–206
- Beracochea D, Lescaudron L, Tako A, Verna A, Jaffard R (1987) Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice: a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res* 25:63–74
- Bison S, Crews F (2003) Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1173–1183

- Blot K, Kimura SI, Bai J, Kemp A, Manahan-Vaughan D, Giros B, Tzavara E, Otani S (2013) Modulation of hippocampus-prefrontal cortex synaptic transmission and disruption of executive cognitive functions by MK-801. *Cereb Cortex*
- Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL (2010) Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 35:2521–2537
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007) Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268–276
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR (2012) Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. *PLoS One* 7:e33249
- Celerier A, Ognard R, Decorte L, Beracochea D (2000) Deficits of spatial and non-spatial memory and of auditory fear conditioning following anterior thalamic lesions in mice: comparison with chronic alcohol consumption. *Eur J Neurosci* 12:2575–2584
- Chanraud S, Pitel AL, Rohlfing T, Pfefferbaum A, Sullivan EV (2010) Dual tasking and working memory in alcoholism: relation to frontocerebellar circuitry. *Neuropsychopharmacology* 35:1868–1878
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855–859
- Dagnas M, Guillou JL, Prevot T, Mons N (2013) HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *J Neurosci* 33:1954–1963
- Dagnas M, Mons N (2013) Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze. *Hippocampus* 23:581–591
- Dar MS (1997) Mouse cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination: possible involvement of cAMP. *Brain Res* 749:263–274
- Day JJ, Sweatt JD (2011) Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96:2–12
- Errico AL, King AC, Lovallo WR, Parsons OA (2002) Cortisol dysregulation and cognitive impairment in abstinent male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1198–1204
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:7–19
- Faria RR, Lima Rueda AV, Sayuri C, Soares SL, Malta MB, Carrara-Nascimento PF, da Silva Alves A, Marcourakis T, Yonamine M, Scavone C, Giorgetti Britto LR, Camarini R (2008) Environmental modulation of ethanol-induced locomotor activity: correlation with neuronal activity in distinct brain regions of adolescent and adult Swiss mice. *Brain Res* 1239:127–140
- Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE (2005) Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 29:971–982
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego
- George O, Sanders C, Freiling J, Grigoryan E, Vu S, Allen CD, Crawford E, Mandyam CD, Koob GF (2012) Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:18156–18161
- Giralt A, Saavedra A, Carreton O, Xifro X, Alberch J, Perez-Navarro E (2011) Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 20:4232–4247
- Kesner RP (2005) Temporal processing of information: the role of the medial prefrontal cortex and hippocampus: theoretical comment on Gilmartin and McEchron. *Behav Neurosci* 119:1705–1709
- Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28:837–850
- Lescaudron L, Beracochea D, Verna A, Jaffard R (1984) Chronic ethanol consumption induces neuronal loss in mammillary bodies of the mouse: a quantitative analysis. *Neurosci Lett* 150:151–155
- Lukoyanov NV, Madeira MD, Paula-Barbosa MM (1999) Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. *Physiol Behav* 66:337–346
- Malvaez M, Mhillaj E, Matheos DP, Palmery M, Wood MA (2011) CBP in the nucleus accumbens regulates cocaine-induced histone acetylation and is critical for cocaine-associated behaviors. *J Neurosci* 31:16941–16948
- Matthews DB, Morrow AL (2000) Effects of acute and chronic ethanol exposure on spatial cognitive processing and hippocampal function in the rat. *Hippocampus* 10:122–130
- Mayfield RD, Harris RA, Schuckit MA (2008) Genetic factors influencing alcohol dependence. *Br J Pharmacol* 154:275–287
- Melis F, Stancampiano R, Imperato A, Carta G, Fadda F (1996) Chronic ethanol consumption in rats: correlation between memory performance and hippocampal acetylcholine release in vivo. *Neuroscience* 74:155–159
- Meng ZH, Pennington SN, Dar MS (1998) Rat striatal adenosinergic modulation of ethanol-induced motor impairment: possible role of striatal cyclic AMP. *Neuroscience* 85:919–930
- Mizuo K, Katada R, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H (2012) Epigenetic regulation of MIR-124 under ethanol dependence and withdrawal. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 47:155–163
- Moonat S, Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Pandey SC (2013) Aberrant histone deacetylase2-mediated histone modifications and synaptic plasticity in the amygdala predisposes to anxiety and alcoholism. *Biol Psychiatry* 73:763–773
- Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (2010) Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67:73–88
- Mosely HF, Georgiou G, Kahn A (2001) Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol Alcohol* 36:357–368
- Pandey SC, Roy A, Mittal N (2001) Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the creb gene transcription factor in rat cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 296:857–868
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729–3737
- Pandey SC, Zhang D, Mittal N, Nayyar D (1999) Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. *J Pharmacol Exp Ther* 288:866–878
- Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Guerri C (2012) Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* 62:2309–2319
- Pascual M, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C (2011) Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptive immune responses in peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol* 89:716–727
- Peixoto L, Abel T (2013) The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* 38:62–76
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz

- L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328:753–756
- Pfefferbaum A, Desmond JE, Galloway C, Menon V, Glover GH, Sullivan EV (2001) Reorganization of frontal systems used by alcoholics for spatial working memory: an fMRI study. *Neuroimage* 14:7–20
- Pierard C, Liscia P, Valteau M, Drouet I, Chauveau F, Huart B, Bonneau D, Jouanin JC, Beaumont M, Beracochea D (2006) Modafinil-induced modulation of working memory and plasma corticosterone in chronically-stressed mice. *Pharmacol Biochem Behav* 83:1–8
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J Neurosci* 32:1884–1897
- Prendergast MA, Mulholland PJ (2012) Glucocorticoid and polyamine interactions in the plasticity of glutamatergic synapses that contribute to ethanol-associated dependence and neuronal injury. *Addict Biol* 17:209–223
- Punch LJ, Self DW, Nestler EJ, Taylor JR (1997) Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinjection of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. *J Neurosci* 17:8520–8527
- Qiang M, Denny A, Lieu M, Carreon S, Li J (2011) Histone H3K9 modifications are a local chromatin event involved in ethanol-induced neuroadaptation of the NR2B gene. *Epigenetics* 6:1095–1104
- Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS, Arnsten AF (2003) Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron* 40:835–845
- Reneerkens OA, Rutten K, Steinbusch HW, Blokland A, Prickaerts J (2009) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology* 202:419–443
- Runyan JD, Dash PK (2005) Distinct prefrontal molecular mechanisms for information storage lasting seconds versus minutes. *Learn Mem* 12:232–238
- Sakharkar AJ, Zhang H, Tang L, Shi G, Pandey SC (2012) Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 36:61–71
- Segal M, Richter-Levin G, Maggio N (2010) Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus* 20:1332–1338
- Soares-Simi SL, Pastrello DM, Ferreira ZS, Yonamine M, Marcourakis T, Scavone C, Camarini R (2013) Changes in CREB activation in the prefrontal cortex and hippocampus blunt ethanol-induced behavioral sensitization in adolescent mice. *Front Integr Neurosci* 7:94
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012) Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* 72:25–33
- Sui L, Wang Y, Ju LH, Chen M (2012) Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 97:425–440
- Szabo G, Hoffman PL, Tabakoff B (1988) Forskolin promotes the development of ethanol tolerance in 6-hydroxydopamine-treated mice. *Life Sci* 42:615–621
- Tabakoff B, Hoffman PL (1988) Genetics and biological markers of risk for alcoholism. *Public Health Rep* 103:690–698
- Vandesquille M, Baudonnet M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Beracochea D (2013) Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal alpha4beta2*-nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging* 34:1599–1609
- Voltaire-Carlsson A, Hiltunen AJ, Koechling UM, Borg S (1996) Effects of long-term abstinence on psychological functioning: a prospective longitudinal analysis comparing alcohol-dependent patients and healthy volunteers. *Alcohol* 13:415–421
- Wang WS, Kang S, Liu WT, Li M, Liu Y, Yu C, Chen J, Chi ZQ, He L, Liu JG (2012) Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *J Neurosci* 32:13763–13775
- Ward RJ, Lallemand F, de Witte P (2009) Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or ‘binge drinking’ alcohol abuse. *Alcohol* 44:128–135
- Watanabe KI, Ogihara-Hashizume A, Kobayashi Y, Mitsushio H, Komiyama T (2001) Impaired sleep during the post-alcohol withdrawal period in alcoholic patients. *Addict Biol* 6:163–169
- You C, Zhang H, Sakharkar AJ, Teppen T, Pandey SC (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
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW (2011) Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* 31:17800–17810
- Zhang HT, Crissman AM, Dorairaj NR, Chandler LJ, O'Donnell JM (2000) Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE4) reverses memory deficits associated with NMDA receptor antagonism. *Neuropsychopharmacology* 23:198–204
- Zhou Z, Yuan Q, Mash DC, Goldman D (2011) Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:6626–6631

Annexe 11: Long-lasting working memory disorders after alcohol-withdrawal are due to excessive corticosterone rise and alteration of CREB phosphorylation in the prefrontal cortex

**Long-lasting cognitive disorders after alcohol-withdrawal are due to
excessive corticosterone rise and reduced CREB phosphorylation in the
prefrontal cortex**

Dominguez Gaelle^{1,2}, Belzung Catherine², Piérard Christophe³, David Vincent¹, Henkous
Nadia¹, Decorte Laurence¹, Mons Nicole¹ and Béracochéa Daniel^{1*}

1. Université de Bordeaux, INCIA CNRS UMR 5287, 33400 Talence, FRANCE
2. Université François Rabelais, Inserm, Parc Grandmont, Tours, FRANCE
3. IRBA (Institut de Recherches Biomédicales des Armées) 92200 Brétigny sur Orge,
FRANCE

* To whom correspondence should be sent.

Address: Dr. Daniel Béracochéa, INCIA, Université de Bordeaux, INCIA UMR
CNRS 5287, Bat B2, Avenue des Facultés, 33405 Talence-cédex FRANCE

Email : daniel.beracochea@u-bordeaux.fr

Phone : (33) 5 40 00 24 39

Abstract (241 words)

This study intended to determine whether long-lasting glucocorticoids (GCs) dysregulation in the prefrontal cortex (PFC) or the dorsal hippocampus (dHPC) play a causal role in working memory (WM) deficits observed after short and prolonged alcohol withdrawal. To that aim, C57/Bl male mice were submitted to a 6 months alcohol consumption (12%v/v) followed by a 1 week or 6 weeks withdrawal periods. Withdrawal induced a WM deficit in a spatial alternation task, a reduction of pCREB immunoreactivity in the PFC and dHPC and an exaggerated corticosterone rise during and after memory testing into the PFC only. All these cognitive and neurobiological alterations were not observed in mice still submitted to alcohol. To determine the causal role of corticosterone in the WM and pCREB alterations of withdrawn animals, we further showed that inhibiting corticosterone synthesis by a systemic metyrapone injection in withdrawn animals enhanced both WM performance and pCREB in the PFC and dHPC. Finally, we showed that spironolactone (an antagonist of mineralocorticoid receptors, MR) but not mifepristone (an antagonist of glucocorticoids receptors, GR) injected into the PFC reversed the WM deficits of withdrawn mice whereas injections into the dHPC have no WM-enhancing effect. Overall, this study provides first direct evidence that alcohol-withdrawal induced a long-lasting GCs dysfunction selectively in the PFC but not HPC, that is responsible for both WM deficits and pCREB alterations and that MR receptors of the PFC mediate the deleterious impact of corticosterone on WM in withdrawn animals.

INTRODUCTION

The cessation of chronic ethanol consumption is often accompanied by several withdrawal symptoms such as increased anxiety, difficulties of concentration and cognitive deficits (1-2). Thus, there is ample evidence that memory deficits are aggravated or progressively develop after alcohol withdrawal (3-5). One of the major disturbances associated with alcohol withdrawal is a dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is responsible for glucocorticoids (GCs) release. More specifically, it has been reported that during an acute withdrawal period, plasma GCs levels are transiently increased (6) and that, up to 2 months after alcohol withdrawal, corticosterone concentrations remained increased in the prefrontal cortex (PFC) and in the hippocampus (HPC) of rodents, in sharp contrast with plasma corticosterone concentrations which returned to the level before the occurrence of withdrawal (7).

Interestingly, it is well known that prolonged exposure to a high concentration of GCs induced delayed memory impairments, working memory (WM) deficits and executive functions disturbances. Thus, in humans, pharmacological (hydrocortisone administration) or pathological (Cushing's disease) increases of cortisol alter WM performance (8-11). Given that, it has been suggested that corticosterone dysregulation could be causally responsible for the cognitive dysfunction observed after alcohol-withdrawal. In agreement with this idea, in abstinent patients, more severe cognitive deficits were found in those alcoholics who had higher cortisol levels during withdrawal (12-13). Moreover, the injection of mifepristone, a GR antagonist, during the acute withdrawal period reduced cognitive disorders in rodents (14).

Other studies pointed out that GCs disturbances after alcohol withdrawal could be responsible for dysfunction of neural plasticity within brain areas involved in WM, such as the PFC and the HPC (15-17). Indeed, one of the mechanisms by which GCs induce WM deficits could be linked with a modification of the intracellular cAMP/PKA signal transduction pathway via GCs (18-20) or mineralocorticoids (MR) receptors (21-22). The prefrontal cortex (PFC) and cAMP-PKA-CREB signaling pathway play a key role in working memory (WM) processes (23-26). Indeed, studies on the role of cAMP-PKA-CREB signaling in PFC-related cognitive functions suggest an inverted-U curve between cAMP-PKA-CREB activity and WM performance (26).

To our knowledge, there exist as yet no studies demonstrating that the brain regional increase of corticosterone concentrations in withdrawn animals plays a causal role in the emergence of CREB phosphorylation (pCREB) alterations and related WM deficits after short or prolonged alcohol-withdrawal periods. Thus, to probe this hypothesis, we studied in a first experiment the effects of short (1 week) versus prolonged (6 weeks) alcohol withdrawal periods occurring after a six months continuous chronic alcohol consumption (CAC) on WM, brain regional pCREB activity and GCs concentrations in the PFC and the dorsal HPC (dHPC). Then, in a second experiment, we determined the causal involvement of regional corticosterone concentrations in both WM and regional pCREB

alterations by investigating in withdrawn animals, whether a pre-test metyrapone injection (an inhibitor of corticosterone synthesis) could attenuate or alleviate WM disorders via the normalization of pCREB activity in the PFC or dHPC. Finally, a third experiment was designed to determine which GCs receptors subtypes mediate the deleterious effects of corticosterone on WM in alcohol-withdrawn mice; to that aim, we injected either into the PFC or the dHPC, prior to memory testing, an antagonist of either the mineralocorticoid receptor (MR; spironolactone) or the GR receptors (mifepristone) in withdrawn animals, to the aim of blocking the action of corticosterone on its receptors.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Procedures

Animals. Animals were mice of the C57/BL6 strains obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and were 6-weeks old at arrival in the laboratory. They were housed by groups of 20 mice until they were 10 months-old in a temperature-controlled colony room ($22\pm 1^\circ\text{C}$), under a 12:12 light-dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). They were provided with food and water or alcohol ad libitum. Two weeks before the experiments, they were housed individually. All procedures were carried out during the light phase of the cycle. All experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Alcohol administration. At 4 months of age, mice were given as their sole source of liquid, increasing concentrated solutions of ethanol (Prochilab) as follows: 4% (v/v) the first week, 8% (v/v) the second week and 12 % (v/v) for 6 consecutive months. At the end of this period, a part of the alcohol-treated mice was withdrawn. In withdrawal groups, ethanol was progressively replaced by water, as follows: 8% (v/v) for 3 days, 4% (v/v) for 3 days then water for the remaining time. Behavioral testing began either after 1 week or 6 weeks of withdrawal (*1W* and *6W* respectively). The remaining alcohol-treated mice (*Alcohol*) remained under alcohol treatment and controls were constituted by a cohort of animals receiving only water (*Water* group) during the same period of time. In the Alcohol group, the level of alcohol in blood measured by an ELISA Kit was very weak at the time of experiment (00:10 AM: $0.57\pm 0.23\text{g/L}$).

Working memory task. The sequential alternation task has been used to study WM (27) and the procedure has been described in full elsewhere (28). Behavioral testing was conducted in a T-maze without any food reinforcement. The procedure involved a training phase constituted by 7 successive trials separated by a 30 sec intertrial interval (ITI); then, 24 hours later, mice were submitted to a test phase similar to the training phase except that the ITI was of lengthened to 90 sec. The number of alternation over trials was scored, and the alternation percentage used as an index of WM. An 8th trial

was added to the series, separated from the 7th one by a 5sec ITI in order to evaluate the motivation to alternate over the series.

Immunohistochemistry. The procedure has been described in full elsewhere (28-29). For each animal, at least three consecutive sections were examined bilaterally and the number of positive nuclei/mm² was averaged. For all immunohistochemistry experiments, results are normalized to those of naïve of respective groups and expressed in percentage of naïve. Countings were made in the following brain regions according to Paxinos and Franklin atlas (2001): PFC: (PL, from bregma:+1.98 to +1.50mm), dorsal CA1 (from bregma: -1.70 to -2.30 mm), ventral CA1 (from bregma: from -2.80 to -3.08mm).

Plasma samples. Blood samples were collected between 08:00 h and 12:00 h before sacrifice for immunohistochemistry, by sub-mandibular procedure with 25 gauge needles after anesthesia (Isoflurane®) in independent groups of mice being either in naïve condition or 30 minutes after the beginning of WM test. The blood was collected in tubes containing 10% EDTA. After 10 min of centrifugation at 3,000 rpm, plasma samples were stored at -80C.

Intracerebral microdialysis during behavioral testing. The procedure has been described in full elsewhere (30). A single guide cannula microdialysis (CMA/7 Microdialysis probe, CMA Microdialysis, Sweden) was implanted above the PFC (anteroposterior + 1.9mm, lateral ± 0.3mm and depth 1.2mm) or above the dHPC (anteroposterior -2mm, mediolateral ±1.4mm, dorsoventral - 0.9mm). After the equilibration phase, baseline dialysates were collected every 15 minutes during 1 hour and 2 hours after the beginning of WM test, with a flow rate of 1µl/min, then, stored at -80C. During behavioral testing, a removable swivel bracket is placed above the maze allowing the mouse to move freely; then the swivel bracket is replaced above the cage at the end of behavioral testing. All dialysates were collected between 08:00 h and 12:00 h before sacrifice.

Plasma and dialysate samples corticosterone assay. A commercially prepared Enzyme Immunoassay kit was used to measure plasma and dialysate samples corticosterone concentrations (Correlate-EIATM, Assay Designs, Ann Arbor, MI). The sensitivity of the assay was 0.08nmol/L. Therefore, baseline sample concentration was more than 10-fold superior than sensibility threshold.

Pharmacological treatments and drug administration. In experiment 2, independent groups have received either Vehicle (5% DMSO in saline) or Metyrapone (35mg/kg; (30). Drugs were dissolved in a solution of 5% DMSO in saline and administered i.p. 30 minutes before WM test in a room different from the behavioral room. In experiment 3, mice were anesthetized with a ketamine (1 mg/kg body weigh)-xylazine (10 mg/kg body weight) solution. Stereotaxic coordinates are expressed in µm from

the bregma. For pharmacological administration in the dHPC and PFC, two stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the surface of the dorsal hippocampus (anteroposterior -2mm, mediolateral \pm 1.4mm, dorsoventral -0.9mm) or PFC (anteroposterior + 1.9mm, lateral \pm 0.3mm and depth 1.2mm). Guide-cannulae were fixed in place with dental cement and three micro screws attached to the skull. All operated mice were allowed to recover in the animal room for at least 7 days before behavioral experiments. GCs antagonists were injected through two 32-gauge stainless-steel cannulae (9 mm length) attached to a microsyringe with polyethylene catheter tubing. The cannulae were inserted into the guide cannulae. The syringes were placed in a constant flow rate pump (0.1 μ L/min). Corticosterone receptors antagonists (RU-38486 - mifepristone- and RU-28318 -spironolactone-; Tocris, USA) at the concentration of 20 ng/mL or vehicle (mock CSF) were bilaterally injected in a volume of 0.25 μ L per side 15 min before behavioral testing. The choice of the dose was already validated according to previous studies (31-32).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the Statview 5.0 software. The data were analyzed using one- or two-way factorial analyses of variance (ANOVAs), followed, when adequate, by post hoc comparisons (Bonferroni/Dunnett's test). Data were expressed as means \pm SEM. Comparisons of WM performances with chance level were calculated with one-sample Student's t-test (with hypothesized mean-chance level=50%). Microdialysis data were analyzed using one- or two-way repeated-measure ANOVA as appropriate, followed, when adequate, by post hoc test (Bonferroni/Dunnett's test).

RESULTS

Experiment 1:

A) Alcohol withdrawal induced long-lasting WM impairments and pCREB phosphorylation alteration in the PFC.

We first investigated whether six months of CAC and withdrawal produce different effects on WM, GCs secretion and pCREB. Thirty minutes after the beginning of the test, cohorts of mice from the *Water* (n=10), *Alcohol* (n=9), *Withdrawal 1W* (n=8) and *6W* (n=9) were killed for collection of blood samples and immunohistochemistry. In addition, blood and brain are collected in naive mice directly from their home cage (*Water* (n=10), *Alcohol* (n=6), *Withdrawal 1W* (n=8) and *6W* (n=7)).

Behavior. Behavioral results (**Fig. 1A**) showed that both *Water* and *Alcohol* groups alternated significantly above chance level (50%) (76.66 \pm 4.44%; t(9)=6.00; p<0.001 and 83.33 \pm 6.21%; t(8)=5.37; p<0.001 respectively). In contrast, both *1W* and *6W* withdrawn mice responded at chance (*1W*: 50.0 \pm 4.45%; p=NS and *6W*: 53.70 \pm 5.40%, p= NS). ANOVA performed on alternation rates yielded a significant between-groups difference (F_(3,32)=9.94; p<0.001). Post-hoc analysis confirmed severe WM impairment in withdrawn groups as compared to both *Water* and *Alcohol* groups (p<0.003

in all comparisons). Choice latency was not significantly different among the groups, whatever the factor considered ($p > 0.05$ in all comparisons). Moreover, all groups exhibited similar ($F_{(3,32)} = 0.18$; NS) and high alternation rates (above 75% in all groups) on the last trial (8th).

Plasma corticosterone assay. Corticosterone concentrations (**Fig. 1B**) were measured in naïve and test conditions. ANOVA revealed no significant between-groups difference in naïve condition ($F_{(3,27)} = 1.9$; NS). In contrast to naïve condition, the test condition induced a significant between-groups difference ($F_{(3,32)} = 3.35$; $p = 0.03$). More precisely, corticosterone concentrations after behavioral testing were greater in *IW* group as compared to *Water* and *6W* groups ($p = 0.004$ and $p = 0.02$ respectively).

Immunohistochemistry. The effects of CAC and withdrawal on changes in pCREB status in PFC (**Fig. 1C**) and both in the dCA1 (**Fig. 1D**) and vCA1 (**Fig. 1E**) of the hippocampus (**Fig. 1D**) were analyzed after WM testing.

ANOVAs showed a significant between-groups difference in the PFC ($F_{(3,32)} = 6.05$; $p = 0.002$) and the dCA1 ($F_{(3,32)} = 8.62$; $p < 0.001$). The post-hoc analyses indicated that, in comparison with *Water* ($+120.05 \pm 30.5\%$) and *Alcohol* ($+113.24 \pm 34.1\%$) groups, withdrawn groups exhibited a significant reduction of pCREB in the PFC (*IW*: $+38.3 \pm 11.7\%$; $p < 0.05$ and *6W*: $-8.5 \pm 11.9\%$; $p < 0.002$ in all comparisons). In contrast, in the dCA1, a decrease of pCREB was observed not only in withdrawn groups but also in mice still under alcohol administration (*Alcohol*: $+57.26 \pm 29\%$, *IW*: $+9.0 \pm 20.9\%$ and *6W*: $+12.45 \pm 24.4\%$; $p < 0.003$ in all comparisons as compared to the *Water* group: $+192.36 \pm 38.3\%$).

In contrast, no significant changes in pCREB levels were observed in the vCA1 (**Fig. 1E**), whatever the experimental group considered (*Water*: $+2.3 \pm 15.5\%$; *Alcohol*: $-24.24 \pm 11.7\%$; *IW*: $+21.6 \pm 23.0\%$; *6W*: $-15.2 \pm 26.8\%$; $F_{(3,32)} = 0.9$; $p = 0.41$).

Fig. 1.F shows representative pCREB immunoreactivity in the PFC for each of the experimental groups.

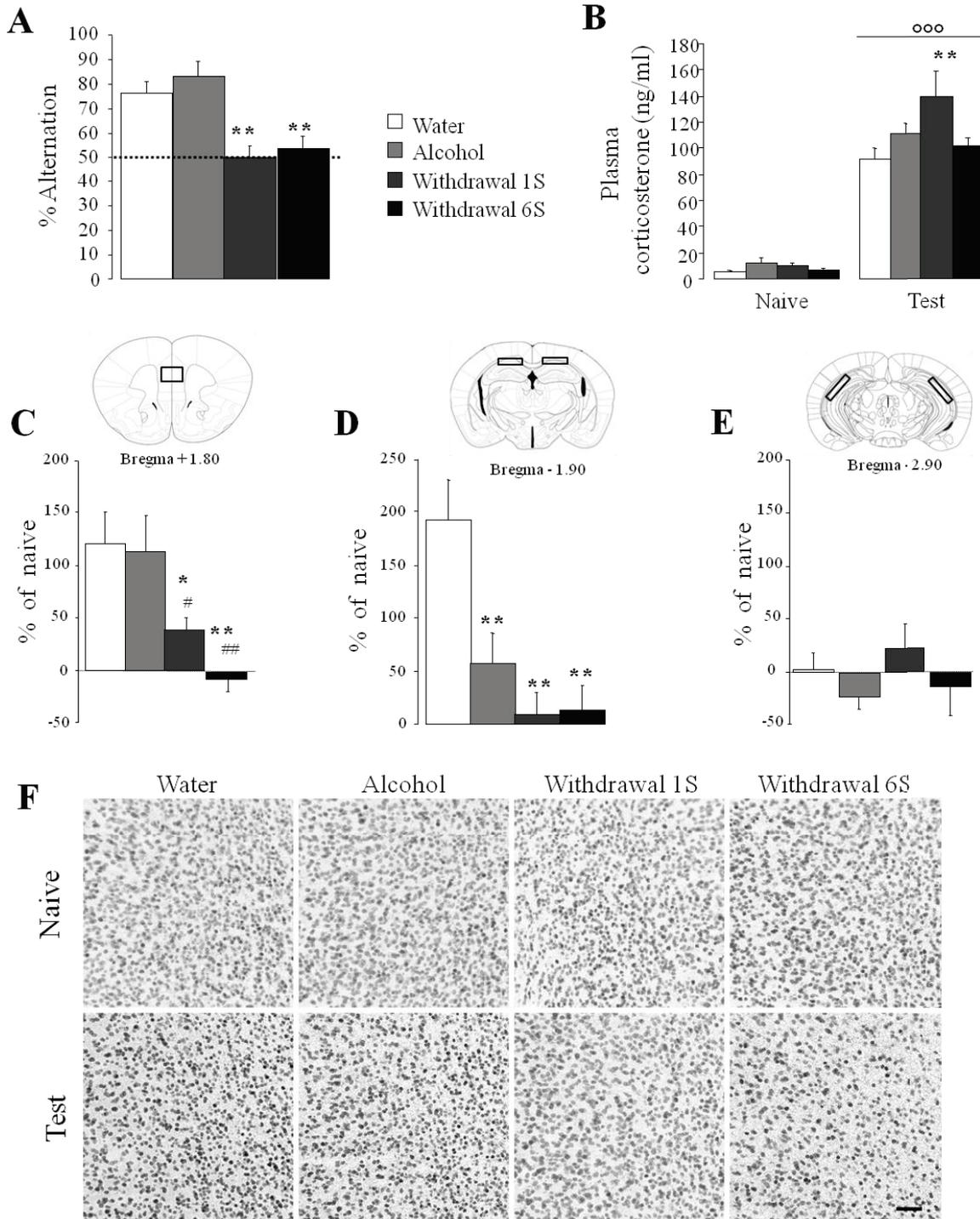


Figure 1. (A) Behavioral results showed that withdrawn *1W* and *6W* mice exhibited lower SA rate as compared to *Water* and *Alcohol* mice. Results is expressed as mean + SEM percentage of alternation, Bars represent mean + SEM. ** $p < 0.01$ vs. *Water* and *Alcohol*. (B): Total plasma corticosterone (ng/ml) in naive condition and 30 min after the beginning of the alternation test in *Water*, *Alcohol* and Withdrawal *1W* and *6W*. * $p < 0.05$ vs. *Water* and Withdrawal *6W*. $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ vs. respective Vehicle groups. (C): pCREB immunoreactivity expressed as mean \pm SEM percentage of changes after behavioral testing relative to naive controls. In the PFC (1C), Withdrawal *1W* and *6W* mice exhibited significantly lower pCREB levels as compared to *Water* and *Alcohol* groups. ** $p < 0.01$, vs. *Water* and *Alcohol*. In the dCA1 (1D), *Water* mice exhibited higher pCREB levels than both *Alcohol* and Withdrawal mice after behavioral testing. ** $p < 0.01$ vs. *Water*. In the vHPC (1E), no between groups difference was observed whatever the statistical comparisons. Fig.(1F): Representative pCREB immunostainings in the PFC for the different naive (top) and trained (bottom) groups. Scale bar, 50 μ m. Magnification: X20.

B) Alcohol withdrawal induced WM impairments and corticosterone rise in PFC during WM testing

We measured the time course evolution of GCs concentrations in PFC and dHPC before, during and after WM testing. For this purpose, independent cohorts of mice were implanted in the PFC (*Water* n=9; *Alcohol* n=8; *Withdrawal 1W* n=10 and *Withdrawal 6W* n=8) or in the dHPC (*Water* n=10; *Alcohol* n=8; *Withdrawal 1W* n=8 and *Withdrawal 6W* n=8).

Behavior. ANOVA analyses revealed a significant between-groups difference ($F_{(3,63)}=9.07$; $p<0.001$). Post-hoc analysis confirmed a severe WM impairment in *1W* ($53.70\pm 3.70\%$) and *6W* ($55.21\pm 4.49\%$) groups as compared to *Water* and *Alcohol* groups ($75.44\pm 3.46\%$ and $75.00\pm 4.54\%$ respectively; $p<0.001$ vs *1W* and *6W* compared to both *Water* and *Alcohol* groups).

Intra-cerebral corticosterone assay. The absolute concentrations (expressed in ng/ml) of baseline corticosterone levels in dialysates (i.e. mean \pm SEM from 4 points measured before behavioral testing) are significantly different between groups in the PFC ($F_{(3,30)}=6.30$; $p=0.019$; *Water*: 0.244 ± 0.03 ; *Alcohol*: 0.399 ± 0.04 ; *1W*: 0.191 ± 0.03 and *6W*: 0.257 ± 0.04) Post-hoc analysis confirmed that the basal corticosterone level is higher in *Alcohol* group relative to the 3 others groups ($p<0.009$). In contrast, no between groups difference was observed in the dHPC ($F_{(3,29)}=2.06$; $p=NS$, *Water*: 0.186 ± 0.02 ; *Alcohol*: 0.212 ± 0.06 *1W*: 0.256 ± 0.04 and *6W*: 0.125 ± 0.01).

Two-way repeated measures ANOVA performed on the time-course evolution of corticosterone evidenced significant differences among the groups in the PFC ($F_{(3,330)}=7.83$; $p<0.001$) but not in the dHPC ($F_{(3,319)}=0.24$; NS). Moreover, a significant time effect is yielded in both structures (PFC: $F_{(11,330)}=20.04$; $p<0.001$; dHPC: $F_{(11,319)}=18.86$; $p<0.001$) without significant group X time interaction effect (PFC: $F_{(33,330)}=1.61$; NS; dHPC: ($F_{(33,319)}=0.6$; NS).

In the PFC (**Fig. 2C**), a progressive and significant rise of corticosterone concentration from 15 to 60 min was observed, with a maximum concentration 45 min after the beginning of behavioral testing in *Water* ($+171.33\%$; $p=0.009$) and *Alcohol* ($+159.69\%$; $p=0.017$) groups. However, in *1W* and *6W* groups, the corticosterone rise lasted from 15 to 105 min as compared to basal level, with a maximum concentration also reached 45 min after the beginning of testing (*1W*: $+253.32\%$; $p=0.009$ and *6W*: $+252.72\%$; $p=0.0006$).

An analysis centered on the first 15 min point after the beginning of behavioral testing showed a significant between groups difference ($F_{(3,30)}=6.16$; $p=0.02$) and revealed more specifically, a significant increase of corticosterone concentrations in *1W* group as compared to *Water* and *Alcohol* groups ($p<0.005$ in all comparisons). A similar observation was made at the 30 min point after the beginning of behavioral testing ($F_{(3,30)}=16.91$; $p<0.001$) except that, at this point, both *1W* and *6W* groups exhibited significant increased levels of corticosterone concentration as compared to the other groups (*Water* and *Alcohol*; $p<0.005$ in all comparisons). No significant between groups difference was observed in the dHPC (**Fig. 2D**) as compared to *Water* and *Alcohol* groups, whatever the time

points considered. Histological localizations of the canulae are represented in Figures 2A(PFC) and 2B (dHPC).

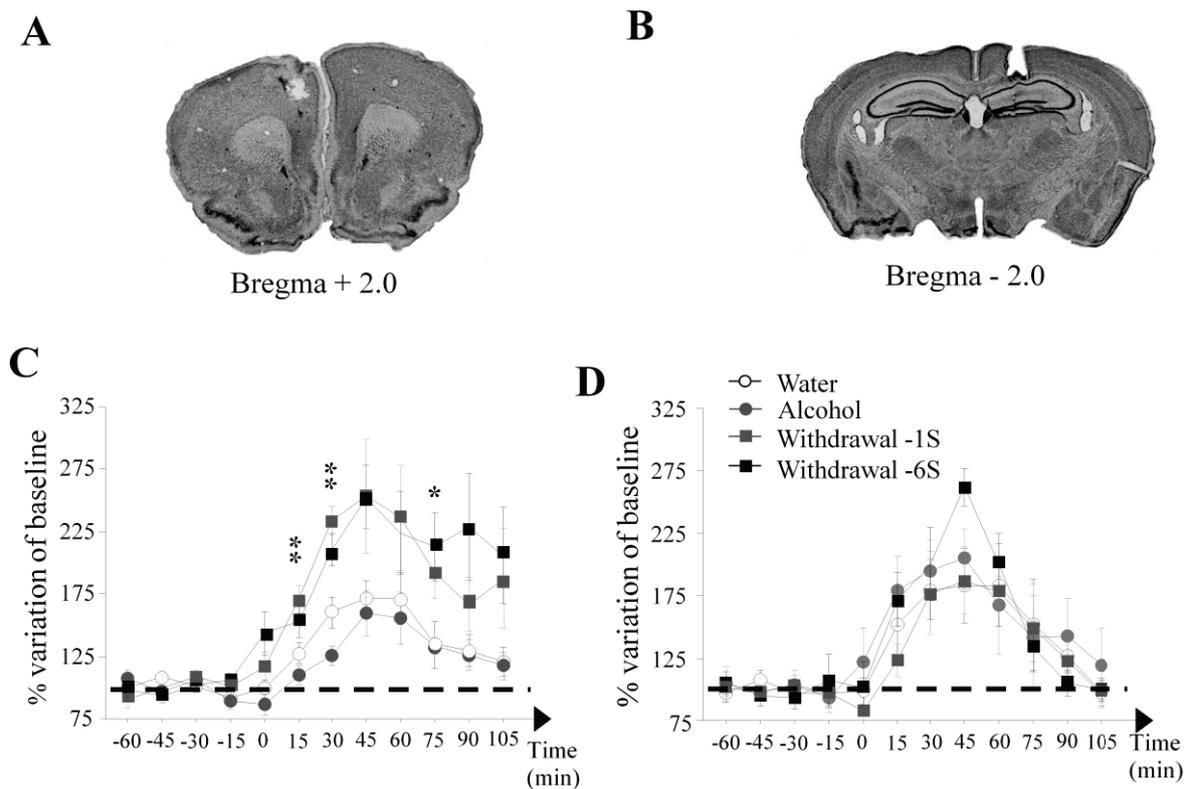


Figure 2. (C-D) Time-course evolutions of test-induced corticosterone rises in the PFC (**C**) and dHPC (**D**) measured by microdialysis in *Water*, *Alcohol*, withdrawal *1W* and *6W* groups before (-60 to 0 min points), during (15 and 30 min points) and after (45 to 105 min points) behavioral testing. Values are expressed as percentage of basal values. At the 15 min point, *1W* mice only significantly differed from alcohol and water groups (** $p < 0.05$); at the 30 min point, *1W* and *6W* groups significantly differed from both *Water* and *Alcohol* (** $p < 0.01$) and this difference remained stable on the other points, from 45 min to 105 min. No between-groups difference was observed in the dHPC (NS in all comparisons).

Experiment 2: The inhibition of corticosterone synthesis alleviates both WM deficits and pCREB alterations in withdrawn mice.

To determine whether corticosterone is implicated in the WM deficits and regional pCREB alterations of withdrawn mice, we examined performance of WM and pCREB immunoreactivity in *Water* and *Withdrawn* groups after a single, i.p. injection of either metyrapone (35 mg/kg; *Water*: n=7, *1W*: n=8 and *6W*: n=8) or vehicle (*Water*: n=11; *1W*: n=8 and *6W*: n=8) administered 30 minutes before WM testing. They were compared to naïve groups, remaining in their home cage (n= 4/5 per group).

Plasma corticosterone assay. In naive condition (**Fig. 3A**), the two-way ANOVA analysis performed on corticosterone data did not evidenced a significant between groups difference ($F_{(2,19)}=0.23$; NS) but showed a treatment effect ($F_{(1,19)}=39.45$; $p<0.001$) without a treatment x test interaction effects ($F_{(1,19)}=0.16$; NS). Metyrapone induces a reduction of corticosterone concentrations in all groups (*Water*: $p=0.03$, *IW*: $p=0.001$ and *6W*: $p=0.009$ for all comparisons as compared to respective vehicle-treated groups). In test condition, ANOVA analysis yielded a significant group effect ($F_{(2,44)}=8.15$; $p=0.001$), a treatment effect ($F_{(1,44)}=192.35$; $p<0.001$) with a significant treatment x test interaction effects ($F_{(2,44)}=7.9$; $p=0.001$). More specifically, all groups receiving metyrapone exhibited a significant reduction of corticosterone concentrations relative to respective Vehicle groups ($p<0.001$ for all comparisons). In vehicle groups and in agreement of the results of experiment 1, the corticosterone concentrations after behavioral testing were greater *IW* group as compared to *Water* and *6W* groups ($p=0.003$ and $p<0.001$ respectively).

Behavior. WM performance is illustrated in **Fig 3B**. Performance during the WM test was above chance level in the Vehicle-*Water* group ($72.72\pm 3.39\%$; $t(10) = 6.71$; $p<0.001$) but not in Vehicle-*Withdrawal* groups (*IW*: $58.33\pm 5.45\%$; $t(7)=1.53$; $p=NS$; *6W*: $54.76\pm 3.07\%$; $t(6)=1.55$; $p=NS$). ANOVAs confirmed a significant between-groups difference ($F_{(2,23)}= 5.82$; $p=0.009$), alternation rates being significantly higher in *Water* as compared to withdrawn mice ($p=0.017$ vs *IW* and $p=0.005$ vs *6W*). Systemic administration of metyrapone improved performance in both *Withdrawn* groups as compared to chance level (*IW*: $81.25\pm 3.77\%$; $t(7)=8.27$; $p<0.001$; *6W*: $70.83\pm 4.16\%$; $t(7)=5.0$; $p=0.001$). Both metyrapone-*Withdrawn* groups exhibited higher alternation rates than respective Vehicle groups (*IW*: $p=0.004$ and *6W*: $p=0.009$). In contrast, metyrapone did not modify performance in the *Water* group ($71.43\pm 4.76\%$; $p=NS$ vs. Vehicle-*Water* group). All groups alternated significantly above chance level at the 8th trial of the test session (data not shown), indicating that withdrawal and/or metyrapone treatment did not affect the motivation to alternate over the series (trials 2-7).

Immunohistochemistry. The metyrapone effects on pCREB immunoreactivity, in the PFC and dCA1, are represented in **Figure 3C**. The results are expressed as mean \pm SEM percentage of changes relative to vehicle groups. ANOVA revealed a different effect of metyrapone according to the groups in the PFC ($F_{(2,20)}= 13.5$, $p<0.001$) but not in the dCA1 ($F_{(2,20)}=0.7$, $p=NS$). A post-hoc analysis centered on PFC, confirms the different effect of metyrapone between *Withdrawn* groups (*IW*: $p<0.001$; *6W*: $p=0.006$) compared to *Water* group. Indeed, the metyrapone increases pCREB only in *Withdrawn* groups (*IW*: $137.7 \pm 22.3\%$ vs vehicle-*IW* and *6W*: $73.1 \pm 25.7\%$ vs vehicle-*6W*) but not in *Water* animals ($-17.7 \pm 6.6\%$ vs vehicle-*Water*).

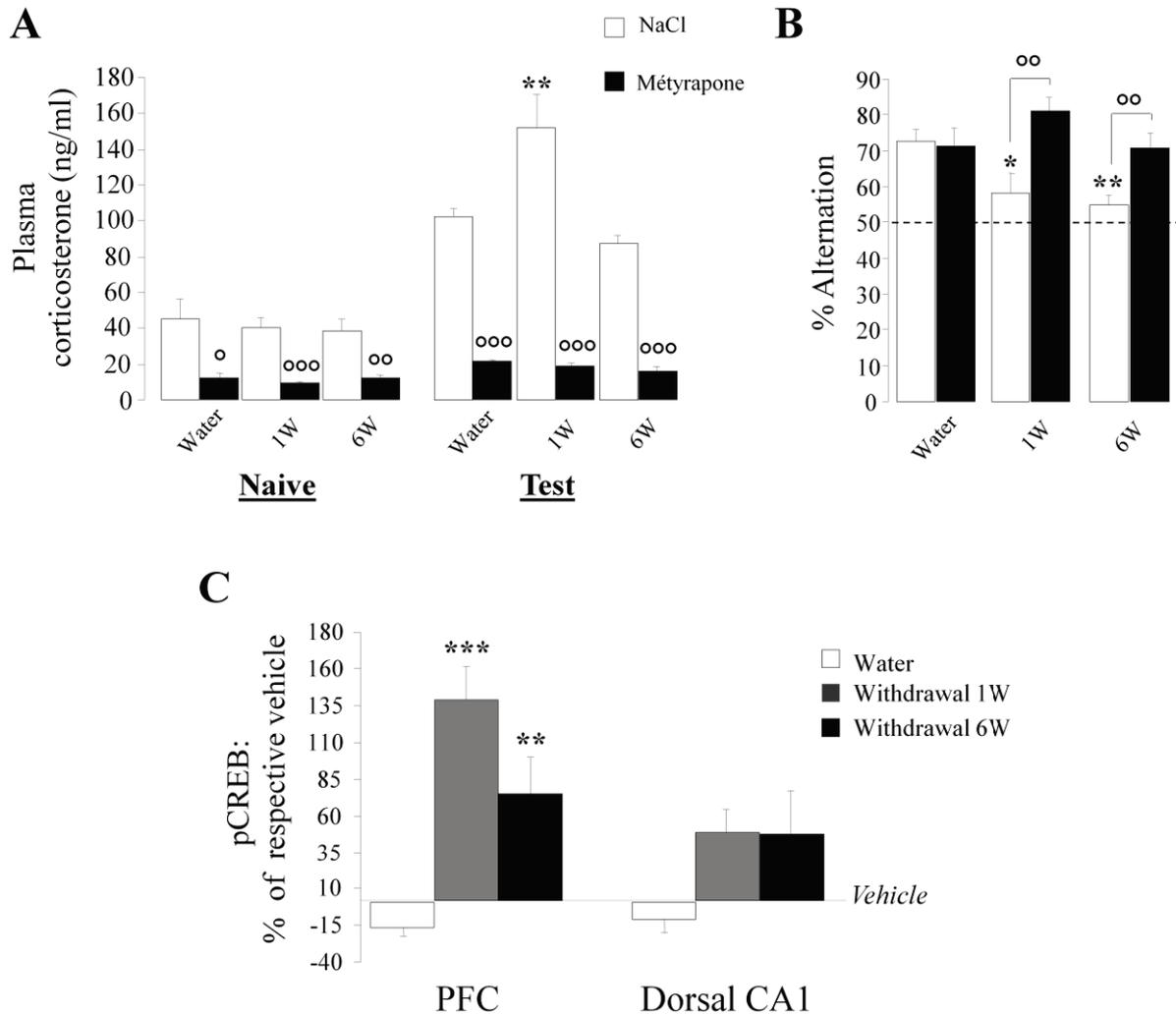


Figure 3. (A) In naïve and test conditions, the metyrapone injection induced a strong reduction of corticosterone concentration (ng/ml). $^{\circ}p < 0.05$, $^{\circ\circ}p < 0.01$ and $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ vs. respective Vehicle groups. $^{**}p < 0.01$ vs. Vehicle-Water and $^{***}p < 0.001$ versus Vehicle-6W mice. (B) Metyrapone injected i.p. 30min before behavioral testing increased alternation rates in both 1W and 6W withdrawn groups. Results are expressed as mean + SEM percentage of alternation, Bars represent mean + SEM. $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ vs. Vehicle-Water mice, $^{\circ\circ}p < 0.01$ vs. respective Vehicle. (C) The results are expressed as mean \pm SEM percentage of changes relative to vehicle groups. Compared with vehicles, metyrapone enhanced pCREB immunoreactivities in 1W and 6W groups in the PFC but not in dCA1. $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ vs. Water.

Experiment 3: injections of spironolactone into the PFC but not the dHPC blocked memory impairments in 1W mice.

A) *Injection into the PFC (Fig 4A).* Mifepristone and Spironolactone were injected in 1W mice ($n=10$ in both groups) and were compared to vehicle-treated (aCSF) mice (1W: $n=12$) and Water animals treated with vehicle (aCSF) Water mice ($n=9$)

ANOVA analyses evidenced a between groups difference ($F_{(3,38)}=7.84$; $p=0.0003$) More precisely, withdrawal induced a significant decrease of alternation rates as compared to Water-aCSF

group ($47.4 \pm 5.6\%$ vs $75.9 \pm 6.2\%$ respectively; $p < 0.05$). Both antagonists increased alternation rates in 1W mice ($66.6 \pm 4.3\%$ and $78.3 \pm 4.3\%$ for mifepristone and spironolactone-treated mice respectively; $p > 0.10$ and $p < 0.01$ respectively as compared to 1W-aCSF treated-mice). Thus, only spironolactone-treated mice exhibited a significant increase of WM performance as compared to vehicles.

B) Injection into the dHPC (Fig. 4B). Mifepristone and Spironolactone were injected in 1W mice ($n=10$ in both groups) and were compared to vehicle-treated (aCSF) mice (1W: $n=11$). Controls were constituted by *Water* animals receiving the vehicle solution (aCSF: $N=9$). ANOVA analyses evidenced a non significant between groups difference ($F_{(3,36)}=2.30$; $p=0.094$).

More precisely, withdrawal induced a significant decrease of alternation rates as compared to the *Water* group ($56.0 \pm 3.3\%$ vs $72.2 \pm 3.9\%$ respectively; $p < 0.05$). Both antagonists did not significantly modified alternation rates in 1W mice ($63.3 \pm 4.1\%$ and $56.6 \pm 7.1\%$ for mifepristone and spironolactone-treated mice respectively; NS as compared to 1W-aCSF treated-mice in both comparison).

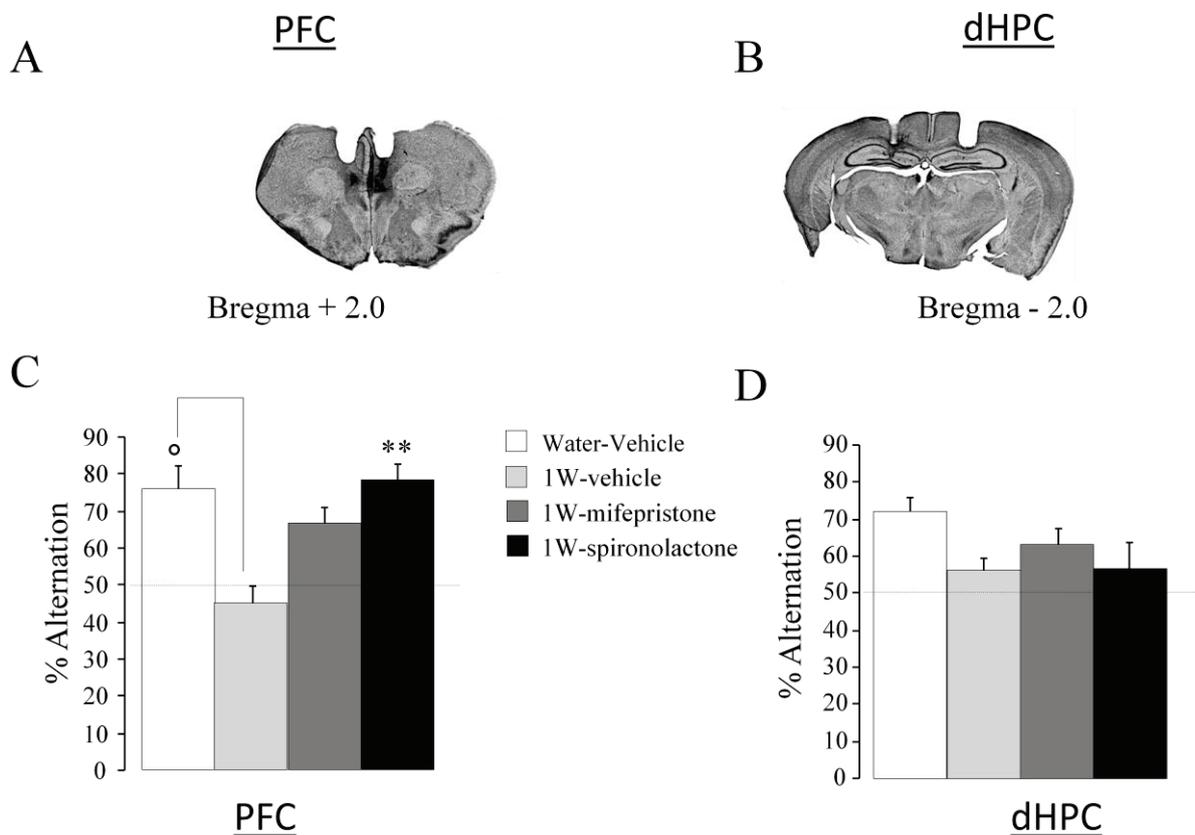


Figure 4. In the PFC (C), withdrawal induced a significant decrease of alternation rate (°: $p < 0.05$ vs *Water*-vehicle). Spironolactone but not mifepristone increases significantly alternation rates as compared to 1W-vehicles ** $p < 0.01$ vs 1W-vehicles. (D) In the dHPC, both antagonists did not significantly modified alternation rates as compared to 1W-vehicles (NS in all comparisons). (A) and (B) are representative localization of canulae in the PFC and dHPC groups.

DISCUSSION

Our study shows that alcohol-withdrawal induced cognitive and neurobiological disorders which are not observed in mice still under alcohol consumption. More specifically, we found in the PFC of withdrawn mice both an increase of corticosterone rise during and after memory testing and pCREB alterations, which were not observed in the Alcohol group, these latter exhibiting only pCREB alterations in the dHPC but spared WM performance. Our data are in agreement with other studies showing that memory deficits are aggravated or progressively develop after the cessation of prolonged alcohol consumption (3-5). Many studies observed increased anxiety-like behavior after the cessation of prolonged alcohol exposure (33). In our experimental conditions, mice presented a transitory increase of anxiety 1 week but not 6 weeks after alcohol withdrawal in an elevated plus maze and in exploratory patterns in a 9 hole-board (*data not shown*). This observation fits well with the increase of plasma corticosterone observed in *1W* but not *6W* animals. Thus,, the WM deficits observed both in *1W* and *6W* mice cannot be the result of withdrawal-induced anxiety-like behavior but must be considered as particularly long-lasting impairments caused by prolonged alcohol consumption.

Our data also indicates that withdrawal-induced WM deficits are specifically caused by a pCREB alteration in the PFC, while the alcohol group showed reduced pCREB levels only in the dCA1 without any WM impairment. Our findings are in agreement with the well-known involvement of the PFC in WM. Indeed, the PFC is known to be implicated in higher cognitive functions, especially WM (34-35). Moreover, the intracellular molecular cascades such as cAMP-PKA-CREB are implicated in WM; Arnsten (26) has shown that both the inhibition and activation of PKA in the PFC impair WM, thereby confirming an inverted-U dose-response curve for cAMP-PKA activity. Alterations in PKA activity and downstream CREB phosphorylation have been observed in various brain regions during alcohol exposure and after withdrawal (36-37). However, the pCREB regulation by alcohol appeared to differ depending on the brain region examined. For example, only withdrawal but not alcohol treatment decreased pCREB levels in cortical structures; in contrast, pCREB alterations were observed in the HPC both during the alcohol treatment and after withdrawal (38-40). Our data confirm these findings since we reported that pCREB is altered in the dHPC both in alcohol and withdrawn groups whereas pCREB in the PFC is altered only in withdrawn animals. In humans, the lower activation of the functional activity of the PFC in detoxified patients has also been observed confirming the alteration of the frontal system during withdrawal (41-43).

Our experiments also indicate that the corticosterone rise during and after the WM task is enhanced in the PFC specifically by withdrawal, since it is not observed in mice still submitted to CAC. Indeed, as regards the test-induced corticosterone rises, no significant between groups difference was observed in dHPC whereas behavioral testing induced a corticosterone concentration rise greater in magnitude and duration in the PFC in withdrawn groups as compared to water and

alcohol groups. Interestingly, such an exaggerated corticosterone rise in the PFC was maintained six weeks after withdrawal, whereas plasma corticosterone level was at baseline. Interestingly, long-lasting brain regional differences in levels of corticosterone have already been observed after alcohol withdrawal (7). One of the most likely hypothesis explaining the persistent changes in corticosterone levels would be that the glucocorticoids local synthesis in tissues could be responsible for the long-lasting changes after withdrawal (44). This hypothesis stressed that the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase-1 (HSD-1) localized particularly in the PFC (45-47) would synthesized corticosterone from locally present inactive cortisone and could therefore locally modulate GCs action in the PFC.

Extensive evidence indicates that excessive levels of GCs induce mPFC dysfunction and WM impairment as observed in depression (48) or Cushing's syndrome (10-11). Similar memory disruptions have been observed in humans and rodents after increased levels of GCs (49-50). GCs could act at least in part via an activation of the intracellular cAMP/PKA signal transduction pathway (18-20). GCs might also synergize with catecholamine (noradrenalin, dopamine) effects in the PFC. Indeed, in stressful situation, the release of GCs is increased as well as the release of catecholamines, which both could impair WM by rapid mechanisms of the intracellular signaling pathways without involving genomic mechanisms (19). Other local mechanisms could also intervene since it has been shown that abstinence from alcohol in rats with a history of escalation of alcohol intake specifically recruited GABA and corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in the mPFC and produced working memory impairments (51).

Thus, to test whether corticosterone can disrupt WM via an alteration of pCREB immunoreactivity, we have pharmacologically modified GCs levels in withdrawn mice and examined the behavioral and molecular repercussions. Our results indicate that the inhibition of corticosterone synthesis in withdrawn mice by an i.p. administration of metyrapone induces an improvement of WM and normalized pCREB in the PFC. These data fit well with the known relationships existing between CREB phosphorylation and GCs. Indeed, Focking et al. (51) evidenced an alteration of CREB phosphorylation and pCREB kinetics in neurons chronically treated with glucocorticoids, demonstrating a crosstalk between the cyclic AMP and glucocorticoids pathway. It has been shown that both MR (21-22) and GR receptors (18-20, 52) are involved in such an interaction. In our study, data from the 3rd experiment showed that spironolactone (a MR antagonist) but not mifepristone (a GR antagonist) injected into the PFC alleviated the WM deficit of withdrawn animals. The involvement of MR rather than GR receptors in WM performance of withdrawn mice could rely on the fact that behavioral testing occurred only 15 min after the antagonist injection, a time span during which MR receptors may be more recruited than GR ones, as shown in earlier studies from our group (31). Moreover, the different impact of spironolactone in the PFC and dHPC could rely on a different impact of withdrawal on the balance dysregulation in the distribution of MR/GR which may persist into the PFC, and explain the lack of any effect of both antagonists when injected into the dHPC. More specifically, it has been already shown that an ethanol treatment and withdrawal decreased

significantly the GR protein levels in cortical and hippocampal regions, whereas normalization occurred during withdrawal *only* in hippocampal areas (53). Taking into account our findings, we thus suggest that the MR antagonist spironolactone could increase the phosphorylation of pCREB in the PFC leading to an improvement of WM performance in withdrawn animals.

In conclusion, our study evidenced a causal link between the long-lasting increase of PFC corticosterone concentrations and both WM deficits and pCREB alterations into the PFC after short (1 week) and prolonged (6 weeks) withdrawal periods. The suppression of the cognitive deficits by blocking MR receptors of the PFC strengthened the importance of regional glucocorticoids dysregulation on long-lasting cognitive and neural activity disorders after alcohol-withdrawal and may open new strategy in the pharmacological prevention of persistent cognitive disorders in alcohol-withdrawn subjects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from IREB (*Institut de Recherche sur les Boissons, Paris France*). This work has benefited from the facilities and expertise of the imagery platform Imag'In (www.incia.u-bordeaux1.fr) which is supported by CNRS and Région Aquitaine. We also like to thank Dr. Frances Ash for language proofreading (contact: ashberac@free.fr).

FINANCIAL DISCLOSURE

We wish to extend the following statements: except for income received from primary employers, no financial support or any compensation has been received from either any individual or corporate entity over the past 3 years for either research or professional service in relation with this study. Further, no single personal financial holding may exist nor be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Voltaire-Carlsson A, Hiltunen AJ, Koechling UM, Borg S (1996): Effects of long-term abstinence on psychological functioning: a prospective longitudinal analysis comparing alcohol-dependent patients and healthy volunteers. *Alcohol*. 13:415-421.
2. Watanabe KI, Ogihara-Hashizume A, Kobayashi Y, Mitsushio H, Komiyama T (2001): Impaired sleep during the post-alcohol withdrawal period in alcoholic patients. *Addict Biol*. 6:163-169.
3. Schandler SL, Clegg AD, Thomas CS, Cohen MJ (1996): Visuospatial information processing in intoxicated, recently detoxified, and long-term abstinent alcoholics. *J Subst Abuse*. 8:321-333.
4. Farr SA, Scherrer JF, Banks WA, Flood JF, Morley JE (2005): Chronic ethanol consumption impairs learning and memory after cessation of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 29:971-982.

5. Lukoyanov NV, Madeira MD, Paula-Barbosa MM (1999): Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. *Physiol Behav.* 66:337-346.
6. Adinoff B, Martin PR, Bone GH, Eckardt MJ, Roehrich L, George DT, et al. (1990): Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and cerebrospinal fluid corticotropin releasing hormone and corticotropin levels in alcoholics after recent and long-term abstinence. *Arch Gen Psychiatry.* 47:325-330.
7. Little HJ, Croft AP, O'Callaghan MJ, Brooks SP, Wang G, Shaw SG (2008): Selective increases in regional brain glucocorticoid: a novel effect of chronic alcohol. *Neuroscience.* 156:1017-1027.
8. Vaz LJ, Pradella-Hallinan M, Bueno OF, Pompeia S (2011): Acute glucocorticoid effects on the multicomponent model of working memory. *Hum Psychopharmacol.* 26:477-487.
9. Terfehr K, Wolf OT, Schlosser N, Fernando SC, Otte C, Muhtz C, et al. (2011): Hydrocortisone impairs working memory in healthy humans, but not in patients with major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 215:71-79.
10. Starkman MN, Giordani B, Berent S, Schork MA, Scheuingart DE (2001): Elevated cortisol levels in Cushing's disease are associated with cognitive decrements. *Psychosom Med.* 63:985-993.
11. Patil CG, Lad SP, Katznelson L, Laws ER, Jr. (2007): Brain atrophy and cognitive deficits in Cushing's disease. *Neurosurg Focus.* 23:E11.
12. Errico AL, King AC, Lovallo WR, Parsons OA (2002): Cortisol dysregulation and cognitive impairment in abstinent male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 26:1198-1204.
13. Keedwell PA, Poon L, Papadopoulos AS, Marshall EJ, Checkley SA (2001): Salivary cortisol measurements during a medically assisted alcohol withdrawal. *Addict Biol.* 6:247-256.
14. Jacquot C, Croft AP, Prendergast MA, Mulholland P, Shaw SG, Little HJ (2008): Effects of the glucocorticoid antagonist, mifepristone, on the consequences of withdrawal from long term alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 32:2107-2116.
15. Wan RQ, Pang K, Olton DS (1994): Hippocampal and amygdaloid involvement in nonspatial and spatial working memory in rats: effects of delay and interference. *Behav Neurosci.* 108:866-882.
16. Lee I, Kesner RP (2003): Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci.* 23:1517-1523.
17. Kesner RP, Churchwell JC (2011): An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem.* 96:417-431.
18. Roozendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (2002): Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci.* 15:553-560.
19. Arnsten AF (2009): Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci.* 10:410-422.
20. Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B (2010): Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:16655-16660.
21. Grossmann C, Ruhs S, Seiferth A, Gekle M (2010): Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling. *Steroids.* 75:539-543.
22. Grossmann C, Wuttke M, Ruhs S, Seiferth A, Mildenerger S, Rabe S, et al. (2010): Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *FASEB J.* 24:2010-2019.
23. Touzani K, Puthanveetil SV, Kandel ER (2007): Consolidation of learning strategies during spatial working memory task requires protein synthesis in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:5632-5637.

24. Dash PK, Moore AN, Kobori N, Runyan JD (2007): Molecular activity underlying working memory. *Learn Mem.* 14:554-563.
25. Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS, Arnsten AF (2003): Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron.* 40:835-845.
26. Arnsten AF, Ramos BP, Birnbaum SG, Taylor JR (2005): Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges. *Trends Mol Med.* 11:121-128.
27. Beracochea D, Lescaudron L, Tako A, Verna A, Jaffard R (1987): Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice: a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res.* 25:63-74.
28. Vandesquille M, Baudonnat M, Decorte L, Louis C, Lestage P, Beracochea D (2013): Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal alpha4beta2*-nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiol Aging.*
29. Dagnas M, Guillou JL, Prevot T, Mons N (2013): HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *J Neurosci.* 33:1954-1963.
30. Chauveau F, Tronche C, Pierard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, et al. (2010): Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus.* 20:196-207.
31. Dorey R, Pierard C, Chauveau F, David V, Beracochea D (2012): Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 37:2870-2880.
32. Dorey R, Pierard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, et al. (2011): Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology.* 36:2639-2649.
33. Kliethermes CL (2005): Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:837-850.
34. Runyan JD, Dash PK (2005): Distinct prefrontal molecular mechanisms for information storage lasting seconds versus minutes. *Learn Mem.* 12:232-238.
35. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004): Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:771-784.
36. Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC (2010): Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 67:73-88.
37. Tabakoff B, Hoffman PL (1988): Genetics and biological markers of risk for alcoholism. *Public Health Rep.* 103:690-698.
38. Pandey SC, Roy A, Mittal N (2001): Effects of chronic ethanol intake and its withdrawal on the expression and phosphorylation of the creb gene transcription factor in rat cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:857-868.
39. Bison S, Crews F (2003): Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 27:1173-1183.
40. Pandey SC, Zhang D, Mittal N, Nayyar D (1999): Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. *J Pharmacol Exp Ther.* 288:866-878.
41. O'Daly OG, Trick L, Scaife J, Marshall J, Ball D, Phillips ML, et al. (2012): Withdrawal-associated increases and decreases in functional neural connectivity associated with altered emotional regulation in alcoholism. *Neuropsychopharmacology.* 37:2267-2276.
42. Moselhy HF, Georgiou G, Kahn A (2001): Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol Alcohol.* 36:357-368.

43. Pfefferbaum A, Desmond JE, Galloway C, Menon V, Glover GH, Sullivan EV (2001): Reorganization of frontal systems used by alcoholics for spatial working memory: an fMRI study. *Neuroimage*. 14:7-20.
44. Davies E, MacKenzie SM (2003): Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30:437-445.
45. Sakai RR, Lakshmi V, Monder C, McEwen BS (1992): Immunocytochemical localization of 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase in hippocampus and other brain regions of the rat. *J Neuroendocrinol*. 4:101-106.
46. Seckl JR, Walker BR (2001): Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 142:1371-1376.
47. Moisan MP, Seckl JR, Edwards CR (1990): 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology*. 127:1450-1455.
48. Hinkelmann K, Moritz S, Botzenhardt J, Riedesel K, Wiedemann K, Kellner M, et al. (2009): Cognitive impairment in major depression: association with salivary cortisol. *Biol Psychiatry*. 66:879-885.
49. Lupien SJ, Gillin CJ, Hauger RL (1999): Working memory is more sensitive than declarative memory to the acute effects of corticosteroids: a dose-response study in humans. *Behav Neurosci*. 113:420-430.
50. Roozendaal B, McReynolds JR, McGaugh JL (2004): The basolateral amygdala interacts with the medial prefrontal cortex in regulating glucocorticoid effects on working memory impairment. *J Neurosci*. 24:1385-1392.
51. George O, Sanders C, Freiling J, Grigoryan E, Vu S, Allen CD, et al. (2012): Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:18156-18161.
52. Focking M, Holker I, Trapp T (2003): Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 304:720-723.
53. Roy A, Mittal N, Zhang H, Pandey SC (2002): Modulation of cellular expression of glucocorticoid receptor and glucocorticoid response element-DNA binding in rat brain during alcohol drinking and withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*. 301:774-784.

Impact d'un sevrage à l'alcool sur l'activité du réseau hippocampo-préfrontal au cours d'une épreuve de mémoire de travail: comparaison avec le stress chronique léger imprédictible

Résumé

Notre étude a pour but de déterminer l'implication de la corticostérone centrale sur l'activité du réseau hippocampe-cortex préfrontal (HPC-CPF) ainsi que son rôle dans l'émergence et le maintien d'altération de la mémoire de travail (MDT) durant l'alcoolisation chronique (12% durant 6 mois), ou bien après un sevrage aigu (1 semaine) ou prolongé (6 semaines). Les effets du sevrage ont également été comparés à ceux résultant d'un stress chronique léger imprédictible (SCLI) modélisant la dépression.

Nos données montrent que le sevrage et le SCLI, mais non l'alcoolisation, induisent des troubles de MDT, un déficit d'activation de pCREB (CPF et HPC) ainsi qu'une augmentation excessive des taux de corticostérone spécifiquement dans le CPF après un sevrage. Sur le plan pharmacologique, l'inhibition de la synthèse de la corticostérone restaure la MDT et l'activité de pCREB dans le CPF, chez les souris sevrées et SCLI. Nos résultats montrent également que l'augmentation de pCREB ou le blocage des récepteurs aux minéralo-corticoïdes, dans le CPF, mais non dans l'HPC, restaure la MDT des souris sevrées. Ces résultats démontrent que la perturbation de taux de corticostérone dans le CPF joue un rôle clé dans l'émergence des troubles cognitifs et neuronaux après un sevrage. Nous avons également montré qu'un traitement chronique au Diazépam atténue ces altérations transitoirement.

Notre étude suggère que des composés agissant sur l'activité de l'axe corticotrope peuvent constituer des stratégies alternatives pour prévenir l'émergence et le maintien des troubles cognitifs induits par le sevrage.

Mot clés: sevrage à l'alcool, corticostérone, cortex préfrontal, hippocampe, mémoire de travail, CREB, anxiété

Résumé en anglais

Our study was aimed to determine the involvement of central corticosterone on the activity of hippocampal-prefrontal cortex (HPC-PFC) network and its role in the emergence of working memory (WM) alterations during chronic alcohol consumption (12% for 6 months), or after a short (1 week) or a prolonged (6 weeks) withdrawal periods. The alcohol-withdrawal effects were compared to those resulting from an unpredictable mild chronic stress (UCMS), modeling depression. Our data showed that withdrawal and UCMS, but not alcohol, induced WM disorders and deficits of CREB activation in both the PFC and HPC, and an excessive corticosterone increase specifically in the PFC of withdrawn animals. Pharmacological experiments showed that the inhibition of corticosterone synthesis restored pCREB activity in the PFC of both withdrawn and UCMS mice and improved WM. Furthermore, in withdrawn mice, the increase of pCREB or the blockade of the mineralo-corticoid receptor in the PFC, but not in the HPC, restored WM performance. These results demonstrated that corticosterone dysfunction into the PFC plays a key role in the long-lasting cognitive and neural activity disorders of alcohol-withdrawn mice. We also showed that chronic administration of diazepam reduced such alterations only transitorily.

Thus, overall, our study suggests that compounds acting on the GCs activity may constitute alternative strategies to prevent the emergence and maintenance of cognitive disorders induced by alcohol withdrawal.

Keywords: alcohol withdrawal, corticosterone, prefrontal cortex, hippocampus, working memory, CREB, anxiety.