

Université de Strasbourg

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
DE STRASBOURG

THESE

présentée pour obtenir le grade de
docteur de l'université de Strasbourg

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par **Olivier Bousiges**

**Rôle de CBP et des acétylations dépendantes de
CBP dans les régulations épigénétiques de la
formation de la mémoire spatiale: étude dans des
modèles pathologiques et implications
thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer**

Soutenue publiquement le 14 avril 2011

Membres du jury

Dr Anne-Laurence BOUTILLIER
Pr Jean-christophe CASSEL
Dr Tanguy Maurice
Dr David BLUM
Dr Jean ZWILLER
Pr Pascal KIENLEN-CAMPARD

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne
Examineur externe

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jean-Philippe Loeffler, directeur de l'unité INSERM U692 « Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence », pour son accueil dans son laboratoire de recherche, ainsi que le Dr Christian Kelche pour son accueil durant les derniers mois de ma thèse au sein du « Laboratoire d'Imagerie et de neurosciences cognitives » dans l'équipe dirigé par le Pr Jean-Christophe Cassel, « Neurobiologie comportementale et cognitive ».

C'est grâce à l'internat de pharmacie que j'ai pu travailler sur cette thèse. Ainsi, je remercie le Dr François Sellal sans qui je n'aurais pas pu ouvrir de poste dans le service de neurologie et qui a accepté que je sois détaché au laboratoire INSERM U692. Je remercie également le chef de service de neurologie des HUS, le Pr Christine Tranchant qui a consenti à ce que je poursuive ma recherche au sein du laboratoire.

Je souhaite adresser mes remerciements aux membres de mon jury, les docteurs David Blum, Tangui Maurice, et Jean Zwiller, ainsi que le professeur Pascal Kienlen-Campard d'avoir accepté de juger mon travail.

Bien évidemment, je remercie grandement le Dr Anne-Laurence Boutillier, mon mentor, qui m'a guidé pas à pas dans l'univers de la recherche. Merci pour tes conseils et ton encadrement.

Je tiens à remercier tout particulièrement 2 membres de l'équipe du Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC – UMR CNRS 7237), à savoir le Pr Jean-Christophe Cassel, qui a co-dirigé cette thèse et merci également au Dr Anne Pereira de Vasconcelos avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à collaborer. Je vous remercie pour vos explications sur les techniques utilisées en comportement et pour lesquelles je ne connaissais pas grand chose avant d'entamer cette thèse. Votre éclairage m'a été d'une grande aide.

Je tiens également à remercier les statutaires du laboratoire U692, à savoir Frédérique, Christian, Yves, Marc, Luc, José, Sylvie. Merci à vous pour vos conseils et votre disponibilité.

Merci à tous mes amis doctorant, à commencer par Romain, qui m'a épaulé tout au long de cette thèse et avec qui j'ai passé d'excellents moments, sans toi cette thèse aurait été beaucoup moins « fun ». Merci à Yannick, toujours prêt à rendre service, Florent, Judith, et Hussein. Merci aux anciens doctorants que j'ai pu croiser et qui m'ont été de bons conseils : Samir, Benoit, Bastien, et Anissa.

Merci à nos très chères techniciennes : Marie-Jo, Pauline, Annie et Brigitte.

J'ai été très heureux de travailler avec vous tous, vous êtes vraiment une équipe super.

Je remercie bien évidemment les membres de l'équipe du LINC, avec qui je n'ai malheureusement pas eu le temps de faire connaissance lors de ces derniers mois au LINC. Je remercie plus particulièrement les techniciennes Brigitte Cosquer et Karine Herbeaux qui ont réalisé les expérimentations comportementales de ce travail de thèse.

Enfin, je finirai ces remerciements par ceux qui me sont le plus cher : ma famille. Tout d'abord, mes parents Annie et Richard, ma sœur Anne-Laure, mon frère Pierre-Emmanuel, je tiens à vous remercier de tout cœur pour vos encouragements et votre soutien.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma belle famille : Jacqueline, René-Paul et Guilhem. Merci pour votre soutien.

Mes remerciements vont enfin à ma femme Lauriane. Je te remercie pour ton abnégation et ton soutien de tous les jours, ton aide m'a été précieuse. Enfin, j'embrasse mes enfants Julian et Eléa qui égayent ma vie chaque jour un peu plus.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative liée à l'âge, qui entraîne une détérioration progressive de la cognition, du comportement, et un déclin fonctionnel conduisant à la démence. Pathologiquement, la MA est caractérisée par la présence de plaques amyloïdes, d'une tauopathie (dégénérescences neurofibrillaires), ainsi que par une mort neuronale massive. Notamment, on note une forte réduction de la région hippocampique, une des structures à la base de la formation de la mémoire. Ces événements sont régis par la mise en place de programmes génétiques spécifiques qui vont, à un moment précis, modifier la transcription de groupes de gènes [et la production de leurs protéines]. Ces programmes vont être à l'origine de la réponse cellulaire, et vont permettre d'augmenter la plasticité cellulaire dans le cas d'un signal cognitif, ou encore provoquer la mort neuronale en réponse à un signal neurodégénératif. Il est maintenant bien établi que les régulations transcriptionnelles des gènes reposent sur un état de "compétence" de la chromatine, lui-même dicté par le code épigénétique.

Notre objectif est de savoir si certaines molécules capables de modifier le code épigénétique peuvent réactiver les programmes génétiques déficients au cours de la pathologie et restaurer un processus mnésique ou retarder la mort neuronale. Cette approche nécessite tout d'abord de décrypter le code épigénétique mis en jeu dans ces processus et ensuite de caractériser dans quelle mesure il est altéré au cours de la pathologie. Nous nous intéressons aux mécanismes de mise en mémoire de l'information spatiale (mémoire à long terme dépendante de l'hippocampe).

Les modifications épigénétiques sont opérées par modifications covalentes des nucléosomes, soit directement sur l'ADN (méthylation), soit sur les histones, sur lesquelles une multitude de modifications post-traductionnelles a été décrite. Une modification majeure des résidus lysine des histones est l'acétylation par les acétyltransférases (HATs). Ces mêmes lysines peuvent être désacétylées sous l'action de désacétylases (HDACs), maintenant ainsi une conformation répressive de la chromatine. De fait, les inhibiteurs de HDACs, permettent de jouer sur ces mécanismes et de provoquer la dé-répression de certains gènes.

La littérature récente implique les voies de transcription dépendantes d'une HAT, la CREB-Binding Protein (CBP) et des acétylations des histones, dans les mécanismes de mémorisation à long terme. Nous étudions les régulations de CBP et d'autres HAT, ainsi que l'état des acétylations des histones dans l'hippocampe de rats ayant suivi un apprentissage spatial en piscine de Morris, et nous essayons de décrypter comment ces modifications sont altérées dans des modèles *in vivo* de rat ayant subi des lésions et montrant des déficiences cognitives similaires à celles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer (modèles développés par le laboratoire du Dr. JC Cassel, UMR CNRS 7237). Nous avons également essayé de déterminer *in vitro* l'implication de la voie glutamatergique sur la dynamique d'acétylation des histones. Notre but est de comprendre si et comment une stratégie basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC ou d'activateurs de HAT peut être efficace pour contrer/retarder les pertes cognitives qui ont un effet dévastateur sur la qualité de vie de ces patients.

Mots clés : Alzheimer, mémoire dépendante de l'hippocampe, acétylations des histones, CREB-binding protein CBP, Histone acetyltransferase HAT, Histone H2B, piscine de Morris, consolidation de la mémoire

| | |
|--|-----------|
| <u>Abréviations</u> | 1 |
| <u>Introduction</u> | 3 |
| I. <u>Introduction générale</u> | 5 |
| II. <u>Les différents types de mémoire</u> | 7 |
| III. <u>Pathologies de la mémoire</u> | 11 |
| IV. <u>Maladie d'Alzheimer</u> | 12 |
| A. <u>Epidémiologie</u> | 12 |
| B. <u>Anatomopathologie</u> | 14 |
| 1) Les plaques amyloïdes | 14 |
| 2) Les dégénérescences neurofibrillaires..... | 16 |
| V. <u>Structures cérébrales impliquées dans la mémoire, importance de l'hippocampe</u> | 18 |
| VI. <u>Modèles de rats cérébro-lésés</u> | 21 |
| VII. <u>Les mécanismes transcriptionnels sont impliqués dans la mémorisation</u> | 23 |
| A. <u>Régulation de la transcription</u> | 23 |
| 1) Les facteurs de transcription | 23 |
| 2) Les mécanismes épigénétiques..... | 25 |
| B. <u>Acétylation des histones et mémoire</u> | 29 |
| C. <u>Histones acétyltransférases (HAT)</u> | 30 |
| 1) Les différentes familles de HAT | 30 |
| 2) Mécanismes d'activation des HAT | 36 |
| 3) Description de la creb binding protein (CBP) | 37 |
| 4) Implication de la creb binding protein (CBP) dans les mécanismes de mémorisation..... | 40 |
| 5) Implication de CBP dans les maladies neurodégénératives | 42 |
| D. <u>Histones déacétylases (HDAC)</u> | 44 |
| E. <u>Mécanismes cellulaires et moléculaires impliquées dans la mémorisation</u> | 48 |
| 1) La plasticité | 48 |
| 2) Les récepteurs glutamatergiques | 49 |
| 3) La potentialisation à long terme | 56 |
| VIII. <u>Présentation de 2 gènes impliqués dans les processus de mémorisation</u> | 64 |
| A. <u>Le brain derived neurotrophic factor (BDNF)</u> | 64 |
| 1) Présentation du BDNF | 64 |
| 2) Régulation du BDNF..... | 68 |
| A. <u>Zif268</u> | 72 |
| 1) Présentation de Zif268..... | 72 |
| 2) Régulation de Zif268 | 72 |
| <u>Objectifs</u> | 75 |

| | |
|--|------------|
| <u>Résultats</u> | 81 |
| Chapitre 1 : <i>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</i> | 83 |
| Introduction | 85 |
| Publication..... | 87 |
| Conclusions | 123 |
| | |
| Chapitre 2 : <i>Étude de l'acétylation de l'histone H2B au cours d'un apprentissage spatial en piscine de Morris</i> | 129 |
| Introduction | 131 |
| Résultats..... | 132 |
| Discussion | 136 |
| | |
| Chapitre 3 : <i>La stimulation des récepteurs NMDA provoque une activation différentielle des acétylations des histones H3 et H2B dans des cultures primaires de neurones</i> | 139 |
| Introduction | 141 |
| Matériels et Méthodes | 143 |
| Résultats..... | 144 |
| Discussion | 153 |
| | |
| <u>Perspectives thérapeutiques</u> | 157 |
| I. <u>Inhibiteurs d'Histones déacétylases (HDACi)</u> | 160 |
| II. <u>Étude de l'implication des inhibiteurs de HDAC dans les processus de mémorisation dépendant de CBP</u> | 162 |
| III. <u>Application thérapeutique des HDACi dans les pathologies de la mémoire</u> | 166 |
| IV. <u>Une nouvelle stratégie thérapeutique : l'utilisation d'activateurs des histones acétyltransférases</u> | 169 |
| | |
| <u>Bibliographie</u> | 171 |
| | |
| <u>Annexe</u> | 209 |

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APP : *amyloid precursor protein*
ARNm : acide ribonucléique messenger
BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*
CA : corne d'Ammon de l'hippocampe
CGN: *Cerebellar granule neurons* (neurones en grains du cervelet)
CamK : *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase*
CBP : *CREB binding protein*
ChIP : *Chromatin Immunoprecipitation*
CpG : cytosine / guanine
CRE : *cAMP response element*
CREB : *cyclic AMP Response Element Binding Protein*
DNMT : DNA méthyl transférase
GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase-3 β*
KID : *kinase inductible domain*
ERK : *extracellular signal-regulated kinases*
GD : Gyrus Denté
HAT : histone acétyl transférase
HC : home cage
HDAC : histone déacétylase
HDACi : inhibiteur des histones déacétylases
HPf : *hidden platform* (plateforme cachée)
LTP : *Long term potentiation* (Potentialisation à long terme)
MA : maladie d'Alzheimer
MAPK : *mitogen activated protein kinase*
MBD : *methyl-CpG binding domain*
NaBu : Butyrate de Sodium
NGF: Nerve Growth Factor
NMDA : N-méthyl D-aspartate
OLM : *object location memory*
ORM : *object recognition memory*

PCAF : *P300/CBP associated factor*

PCR : *polymerase chain reaction*

PKA: protéine kinase A

PS : préséniline

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SAHA : *suberoylanilide hydroxamic acid*

SEM : *standard error of the mean*

SLA : sclérose latérale amyotrophique

TNF : *tumor necrosis factor*

TSA : trichostatine A

VPA : *valproic acid*

VPf : *visible platform* (plateforme visible)

INTRODUCTION

I. Introduction générale

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires liés aux processus de mémorisation qui pourraient être affectés dans des pathologies de la mémoire telles que la maladie d'Alzheimer (MA).

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative liée à l'âge qui se traduit par une perte progressive de la mémoire avec notamment une perte de la mémoire antérograde, les patients sont alors incapables d'apprendre de nouvelles informations. L'évolution de la maladie va entraîner une atteinte de la mémoire rétrograde avec au fur et à mesure une perte des souvenirs anciens. Elle se caractérise également par une désorientation temporo-spatiale, une atteinte du langage, une incapacité à reconnaître les personnes familières mais aussi par des modifications du comportement et de la personnalité conduisant à la démence. D'un point de vue histologique, le cerveau présente des plaques séniles ou plaques amyloïdes constituées de peptides A β générés par clivage protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP) et d'une tauopathie (dégénérescences neurofibrillaires contenant la protéine Tau anormalement phosphorylée), ainsi que par une mort neuronale massive. En effet, elle se caractérise anatomiquement par une atrophie de l'écorce cérébrale localisée surtout aux régions pariéto-temporo-occipitales, une dilatation des ventricules cérébraux et on note une forte réduction de la région hippocampique, chez les patients atteints de MA (Mattson, 2000). A noter que cette neurodégénérescence au niveau de l'hippocampe, pourrait être liée non seulement aux dysfonctions cholinergiques dans le cerveau basal antérieur (Parihar and Hemnani, 2004), mais également à une mort neuronale dans le cortex entorhinal qui débute à un stade précoce de la maladie (Stoub et al., 2005).

Dans la maladie d'Alzheimer les perturbations neurologiques de l'hippocampe sont à l'origine des premiers troubles mnésiques et notamment de la désorientation spatiale. C'est pourquoi, dans nos expérimentations, nous nous sommes intéressés à certaines régulations physiologiques de l'hippocampe de rats dans un contexte mettant en jeu la mémoire spatiale.

Il faut savoir que de nombreuses activités physiologiques, tels que la formation et la consolidation de la mémoire à long terme, ou pathologiques, tels que la mort neuronale, nécessitent des processus cellulaires et moléculaires. Ces événements sont régis par la mise en place de programmes génétiques spécifiques qui vont, à un moment précis, modifier la transcription de groupes de gènes (et la production de leurs protéines). Ces programmes vont être à l'origine de la réponse cellulaire, et vont permettre d'augmenter la plasticité cellulaire

dans le cas d'un signal cognitif, ou encore provoquer la mort neuronale en réponse à un signal neurodégénératif. Il est maintenant bien établi que les régulations transcriptionnelles des gènes reposent sur l'état conformationnel de la chromatine. En effet, la chromatine qui correspond à un enchevêtrement d'ADN, de protéines histones et de protéines non histone, est très dynamique : elle peut subir des enroulements sur elle-même ou des dé-enroulements plus ou moins importants. On distingue notamment un état très compacté de la chromatine, appelé hétérochromatine, dans lequel les gènes sont peu accessibles à la machinerie transcriptionnelle et donc souvent non exprimés ou silencieux. A l'inverse, l'euchromatine correspond à un état de décondensation de la chromatine, beaucoup plus accessible aux molécules intervenant dans la transcription et permettant par conséquent l'expression des gènes. Les remaniements épigénétiques vont correspondre à des modifications post-traductionnelles de protéines histones, de protéines non-histones, ou encore de l'ADN. Ainsi, les mécanismes épigénétiques vont permettre d'agir sur la conformation chromatinienne, conduisant, dans le cas d'une décondensation, au recrutement, via des facteurs de transcription, de la machinerie cellulaire nécessaire à la transcription des gènes.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux acétylations et aux déacétylations des histones. En effet, il a été montré que cette balance des acétylations jouait un rôle dans les mécanismes de mémorisation mais également dans des maladies neurodégénératives (revues Rouaux et al., 2004 ; Graff and Mansuy, 2008) et présenterait donc un intérêt tout particulier dans la MA.

Dans ce travail, nous avons étudié l'acétylation des histones, ainsi que quelques-unes des molécules responsables de ces changements, telle que la *CREB binding protein* (CBP), qui pourraient rendre compte d'une consolidation de la mémoire spatiale. De même, nous nous sommes intéressés à ces processus dans un modèle lésionnel de rat mimant les troubles mnésiques de la maladie d'Alzheimer et notamment les troubles de la mémoire spatiale. Cela nous a permis de déterminer si ces mécanismes étaient touchés dans l'hippocampe lorsque l'on a une atteinte mnésique dépendante de l'hippocampe. Nous avons travaillé également sur un modèle *in vitro* de culture primaire en grains de cervelet, afin d'identifier les régulations post-traductionnelles dans les neurones en réponse à l'activation des récepteurs NMDA, un support majeur du contrôle de l'activité synaptique et des fonctions de mémorisation.

Une meilleure connaissance de ces processus moléculaires impliqués dans la mémorisation permettrait, en effet, de mettre en évidence des marqueurs moléculaires de la mémoire et ainsi de pouvoir cibler pharmacologiquement, de manière spécifique, ces marqueurs altérés dans la MA afin de restaurer les fonctions cognitives.

II. Les différents types de mémoire

Pour bien comprendre les pathologies de la mémoire, il faut se pencher sur les processus de mémorisation qui sont des mécanismes complexes. Il existe différents types de mémoire qui prédominent chez l'homme. Le critère de la durée du souvenir permet de distinguer au moins trois types de mémoire : la mémoire sensorielle, la mémoire à court terme et la mémoire à long terme (figure 1) (Squire et al., 1993).

La mémoire sensorielle conserve fidèlement mais très brièvement l'information apportée par les sens. Sa durée est si courte (de l'ordre de quelques centaines de millisecondes à une ou deux secondes) qu'elle est souvent considérée comme faisant partie du processus de perception. Elle n'en constitue pas moins un passage obligé pour le stockage dans la mémoire à court terme (Squire et al., 1993).

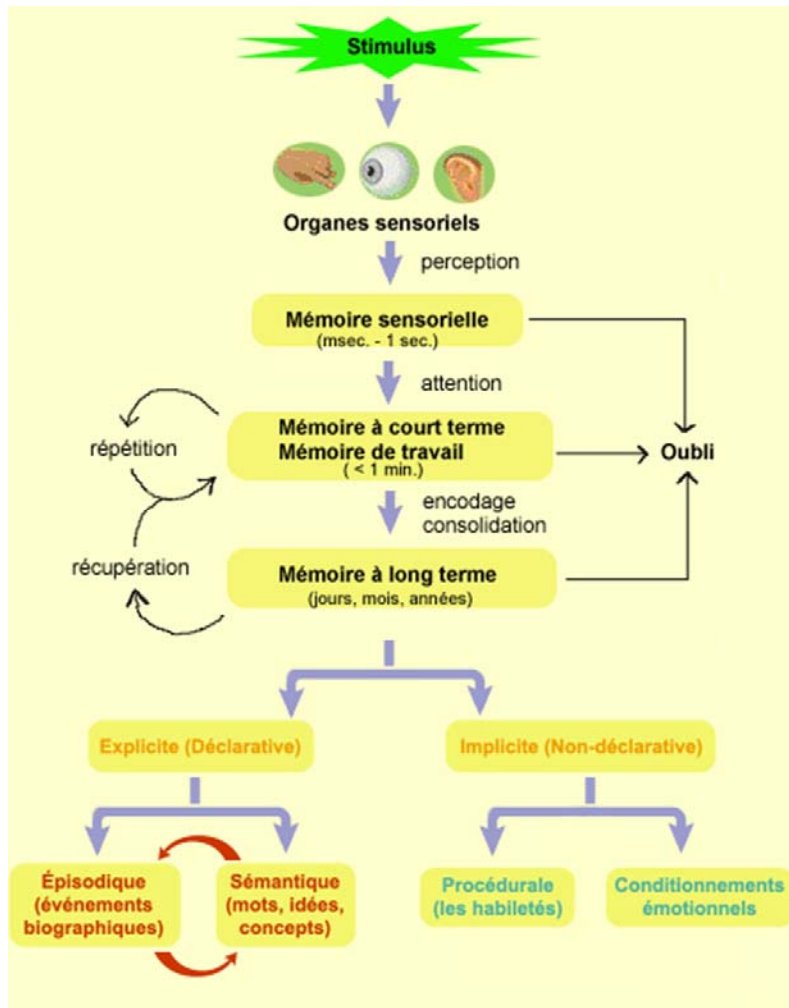


Figure 1 : Les différents types de mémoire

Les organes sensoriels perçoivent les stimuli qui restent très peu de temps dans la mémoire sensorielle. Seule l'attention portée au stimulus permettra la mémorisation de celui-ci dans la mémoire à court terme (ou mémoire de travail). Certains mécanismes, tels que la répétition, vont permettre la mise en route de l'encodage et de la consolidation de l'information dans la mémoire à long terme. Cette mémoire se décline en mémoire explicite et en mémoire implicite. La mémoire explicite se scinde en mémoire épisodique et mémoire sémantique. La mémoire implicite comprend la mémoire procédurale et les conditionnements émotionnels (adapté de squire and Zola-Morgan, 1991).

La mémoire à court terme, appelé également mémoire de travail, correspond à la rétention temporaire de l'information en cours de traitement. Sa fonction est de permettre un stockage temporel et en même temps d'effectuer un certain nombre de traitements. Par exemple, la mémoire de travail va permettre de retenir un numéro de téléphone pendant le temps de le composer. Celui-ci se dissipera rapidement et définitivement si on ne fait pas un effort conscient pour s'en rappeler. Le registre à court terme semble avoir une capacité de stockage limitée (environ 7 items), elle ne dure que quelques dizaines de secondes seulement, mais avec une vitesse de stockage et de lecture très rapide. Le traitement qu'elle effectue consiste à maintenir l'information disponible le plus longtemps possible et permettre ainsi la liaison avec les informations de la mémoire à long terme. Le passage de la mémoire à court

terme à la mémoire à long terme s'effectue grâce à l'hippocampe (Squire et al., 1993 ; Tulving, 2002).

Une fois dans la mémoire à long terme, l'information peut s'y maintenir pendant une très longue période : plusieurs jours, plusieurs mois et parfois même pour la vie (Frankland and Bontempi, 2005). La mémoire à long terme comprend la mémoire des faits récents, où les souvenirs sont encore fragiles, et la mémoire des faits anciens, où les souvenirs ont été consolidés. Elle peut être schématisée comme la succession dans le temps de 3 grands processus de base : l'encodage, le stockage et la restitution (ou récupération, ou rappel) des informations.

L'encodage vise à donner un sens à la chose à remémorer. Par exemple, le mot "citron" peut être encodé de la manière suivante : fruit, rond, jaune. Si ce mot n'est pas spontanément restitué, l'évocation d'un indice issu de l'encodage (par exemple : fruit) permettra de le retrouver. De la profondeur de l'encodage, donc de l'organisation des données, dépendra l'efficacité de la récupération. De plus, le processus d'encodage fait référence non seulement à l'information ciblée, mais également à son contexte environnemental, cognitif et émotionnel. Enfin, l'association d'idée ou d'images par des moyens mnémotechniques (comme le fameux "Mais où est donc Ornicar ?") contribuent à créer des liens qui facilitent l'encodage.

Une information, même bien encodée, est toujours sujette à l'oubli. Le stockage peut être considéré comme le processus actif de consolidation rendant les souvenirs moins vulnérable à l'oubli. C'est cette consolidation qui différencie le souvenir des faits récents du souvenir des faits anciens qui, eux, sont associés à un plus grand nombre de connaissances déjà établies. Le sommeil, dans sa phase paradoxale notamment, ainsi que les révisions (scolaires, par exemple) jouent un grand rôle de consolidation (Maquet et al., 2010).

Finalement, la restitution (ou récupération) des souvenirs, volontaires ou non, fait appel à des mécanismes actifs qui vont utiliser les indices de l'encodage (Muzzio et al., 2009). L'information est alors copiée temporairement de la mémoire à long terme dans la mémoire de travail pour être utilisée. Plus un souvenir sera codé, élaboré, organisé, structuré, plus il sera facile à retrouver. On comprend alors que l'oubli peut être causé par des défaillances à chacune de ces étapes : mauvais encodage, trace insuffisamment consolidé ou difficulté de récupération.

La mémoire à long terme peut elle-même englober différents types de mémoire (figure 1). L'une de ces distinctions qui apparaissent comme des plus fondamentales est celle que l'on

fait entre les mémoires explicites (ou déclaratives) et celles qui sont implicites (ou non-déclaratives), selon que l'on peut ou non en exprimer verbalement le contenu (Baddeley et al., 2001).

La mémoire explicite nous permet de nous rappeler consciemment les faits et les choses. Cette mémoire semble donc favoriser l'encodage d'informations relatives à l'identité, la fonction et les attributs d'un objet. Elle peut elle-même être subdivisée en mémoire épisodique et mémoire sémantique (Baddeley et al., 2001).

La mémoire épisodique, parfois appelée autobiographique, permet à un sujet de se rappeler des événements qu'il a personnellement vécus dans un lieu et à un instant donné. La charge émotionnelle vécue par le sujet au moment des faits va conditionner la qualité de la mémorisation épisodique (Banich et al., 2009).

La mémoire sémantique est le système par lequel l'individu stocke sa connaissance du monde. C'est une base de connaissances que nous possédons tous et dont une grande partie nous est accessible rapidement et sans effort. C'est la mémoire du sens des mots, celle qui nous permet de se souvenir du nom des grandes capitales, mais aussi des coutumes sociales, de la fonction des choses, de leur couleur ou de leur odeur (Squire et al., 1993).

La mémoire implicite est une forme « inconsciente » de mémoire. Il s'agit d'une forme de mémoire où l'on ne retient pas l'expérience qui en est à l'origine. De plus, le rappel d'un souvenir encodé dans la mémoire implicite se fait automatiquement, sans les efforts de rappel nécessaire à la mémoire épisodique (Squire et al., 1993).

La mémoire procédurale fait partie de la mémoire implicite, elle permet l'acquisition d'habiletés et l'amélioration progressive de ses performances motrices. C'est cette mémoire qui permet, par exemple, de conduire sa voiture ou de manger sans devoir être totalement concentré sur ces tâches. La mémoire procédurale est constituée d'automatismes sensorimoteurs si bien intégrés que nous n'en avons plus conscience.

Beaucoup de nos conditionnements émotionnels et de nos réflexes conditionnés sont également du domaine de la mémoire implicite. L'apprentissage associatif qui est à la base de ces formes de mémoire est un processus très ancien phylogénétiquement qui peut se faire sans l'intervention de la conscience (Squire et al., 1993).

III. Pathologies de la mémoire

Ainsi, la mémoire à long terme contient nos souvenirs, nos apprentissages et toute l'information dont on a fait l'effort conscient de se rappeler. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent rendre ces souvenirs difficiles à récupérer : comme la durée qui nous sépare de l'événement mémorisé, depuis quand nous nous sommes rappelé de l'événement pour la dernière fois, son degré d'intégration avec nos autres connaissances, sa ressemblance avec un événement présent, etc... mais ces problèmes mnésiques peuvent également être liés à certaines pathologies. Les maladies de la mémoire sont les amnésies. Elles touchent le plus souvent la mémoire épisodique, alors que la mémoire sémantique est habituellement épargnée par les amnésies (à l'exception des cas évolués de maladie d'Alzheimer) du fait qu'il s'agisse d'une mémoire de référence qui renferme des informations accumulées de façon répétée durant toute notre vie. De même, la mémoire procédurale est souvent préservée chez les patients souffrant d'amnésie profonde.

Les amnésies peuvent être classées selon la présence ou non de lésions : les amnésies psychogènes (découlant d'un traumatisme psychique) et les amnésies neurologiques (avec lésions organiques) ; ou selon l'incapacité de se souvenir ou de reconnaître de nouvelles informations ou de nouveaux événements survenus après (amnésie antérograde) ou avant (amnésie rétrograde) le début de l'amnésie.

Les amnésies psychogènes sont des désordres de la mémoire qui résultent de traumatismes psychologiques. Bien que ces traumatismes affectent le cerveau d'une certaine manière, il n'y a pas de lésion décelable ou de dysfonctionnement décelable dans le cerveau de ceux qui en souffrent.

Les amnésies neurologiques sont causées par des dommages spécifiques au cerveau, généralement dans la région où l'on retrouve l'hippocampe. Ces lésions peuvent survenir suite à un traumatisme crânien, un accident cérébro-vasculaire, une tumeur (qui écrase une partie du cerveau), une hypoxie, une chirurgie cérébrale, certaines encéphalites, certains médicaments, certains types d'épilepsie (avec sclérose de l'hippocampe), un alcoolisme chronique (appelé syndrome de Korsakoff qui est dû à une carence en vitamine B1), etc. Mais l'amnésie neurologique la plus répandue est la maladie d'Alzheimer.

IV. La maladie d'Alzheimer (MA)

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative liée à l'âge et caractérisée par un ensemble de troubles cognitifs et psycho-comportementaux. Cette maladie va se traduire par une perte progressive de la mémoire. Ce déclin de la mémoire se manifeste initialement comme une perte de la mémoire épisodique qui est considérée comme une sous-catégorie de la mémoire déclarative (LaFerla et al., 2007). Cette dysfonction de la mémoire épisodique gêne le rappel d'évènements récents incluant les activités autobiographiques. La mémoire de travail est aussi touchée. La maladie va se traduire également par une désorientation temporo-spatiale, du langage, de la capacité à reconnaître les autres mais aussi par des modifications du comportement et de la personnalité. Ces caractéristiques vont évoluer et s'aggraver toute au long de la maladie et conduire à la démence et à la mort.

A. Épidémiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) constitue approximativement 70 à 75% des cas de démence (Fratiglioni et al., 1999 ; Small et al., 1997). L'incidence de la maladie augmente avec l'âge, doublant tous les 5 à 10 ans. La prévalence augmente aussi exponentiellement avec l'âge, atteignant 3% parmi les 65-74 ans et de 24 à 33% pour les 85 ans et plus (Lahiri et al., 2007). La MA affecte 25 millions de personnes dans le monde. Aux USA la prévalence est estimée à 5 millions de personnes et à 860 000 en France en 2007 et il est prévu une augmentation jusqu'à 13 millions de personnes en 2050 uniquement aux USA (Hebert et al., 2003).

L'épidémiologie permet de distinguer deux formes de maladie d'Alzheimer : une forme héréditaire (génétique) et une forme « sporadique » (non génétique). La forme sporadique est la plus répandue (99% des cas) et touche les personnes de plus de 65 ans alors que la forme familiale peut débuter avant 65 ans et est transmise sur le mode autosomique dominant (Lambert and Amouyel, 2007).

Ces formes familiales correspondent à l'atteinte d'un de ces 3 gènes : APP, preseniline (PS) 1 et 2 (Goate et al., 1991 ; Levy-Lahad et al., 1995 ; Sherrington et al., 1995).

Pour le gène APP (*amyloid precursor protein*), il a été décrit plus d'une trentaine de mutations différentes (www.molgen.ua.ac.be/admutations), toutes présentes aux alentours du site de clivage qui détermine le métabolisme de l'APP et par conséquent la production de

peptide amyloïde. En plus de ces mutations, la duplication du gène APP apparaît être une cause de certaines formes autosomiques dominantes (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Cela suppose que la surexpression de ce gène est suffisant pour provoquer la MA. Ce gène est situé sur le chromosome 21 ce qui expliquerai que les personnes présentant une trisomie 21 développe plus facilement cette maladie. Les premiers résultats de l'étude du promoteur du gène de l'APP indiquent que les variations génétiques sur le promoteur peuvent modifier le risque de développer la MA (Theuns et al., 2006).

Cent quatre vingt quatorze mutations du gène PS1 ont été décrites (www.molgen.ua.ac.be/admutations). Le gène PS1 (qui est situé sur le chromosome 14) code une protéine qui est intégrée au complexe γ -secrétase et sa mutation induit une augmentation relative de la production de peptides $A\beta_{1-42}$ (Wolfe et al., 1999).

Plus d'un vingtaine de mutations du gène PS2 (qui est situé sur le chromosome 2) ont été décrites (www.molgen.ua.ac.be/admutations). Certaines mutations du gène de PS2, comme celles du gène de PS1, sont associées avec une augmentation de la production des peptides $A\beta_{1-42}$.

Les liens entre les mutations, les fonctions des gènes mutés et le développement de la maladie mènent à l'hypothèse physiopathologique de la cascade amyloïde. L'association systématique des mutations pathogéniques avec des modifications du métabolisme de l'APP et plus particulièrement avec la surproduction relative des peptides $A\beta_{1-42}$ indiquent que ce métabolisme est au cœur du mécanisme impliqué dans la formation de la MA, ou tout au moins dans les formes génétiques de la maladie.

Il faut noter que les formes sporadiques sont opposées aux formes génétiques, or un autre gène semble impliqué dans la MA, mais pas sur le mode autosomique dominant, et est donc considéré comme facteur de risque des formes sporadiques. Il s'agit du gène de l'*Apolipoprotein E* (ApoE) qui exprime 3 isoformes de la protéine, l'ApoE2, l'ApoE3 et l'ApoE4 qui ne diffèrent entre elles que de quelques acides aminés, mais seule l'ApoE4 est un facteur de risque de la maladie (Lambert and Amouyel, 2007).

Les autres facteurs de risque les plus couramment rapportés dans les études épidémiologiques sont bien évidemment l'âge et l'existence d'antécédents familiaux de démence. Le niveau d'éducation est également un facteur. Plusieurs études ont montré une plus grande fréquence de démence chez les sujets de bas niveau d'éducation (Cobb et al., 1995 ; Chibnall et al., 1998 ; Shadlen et al., 2006 ; Wilson et al., 2009). L'activité physique aurait un effet positif sur les fonctions cognitives des personnes âgées (Yaffe et al., 2001 ; Barnes et al., 2003) et permettrait une diminution de 30 à 50% des déclin cognitifs (Karp et

al., 2006 ; Abbott et al., 2004). Les femmes sont plus touchées que les hommes et cela ne peut pas être simplement attribué à la plus grande longévité des femmes par rapport aux hommes (Vina and Lloret, 2010). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'effet protecteur des œstrogènes (Andersen et al., 1999) et la diminution endogène des œstrogènes est liée à une augmentation du risque de MA (Paganini-Hill and Henderson, 1994). Ainsi, le traitement hormonal substitutif de la ménopause et associé à un facteur de risque plus bas de développer la MA (Paganini-Hill and Henderson, 1994 ; Zandi et al., 2002). D'autres médicaments ont également été corrélés positivement ou négativement avec les démences. Les statines en diminuant les niveaux de cholestérols semblent réduire le risque de démence (Zandi et al., 2005 ; Wolozin et al., 2007). Les antihypertenseurs, tels que la nitrendipine ou l'enapranil peuvent baisser l'incidence de démence de 50% (Forette et al., 1998). Le perindopril a été associé à une réduction du déclin cognitif (Lithell et al., 2003). Enfin les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pris sur le long terme pourraient baisser le risque et ralentir la progression de la MA (Heneka and O'Banion, 2007 ; Rich et al., 1995 ; Szekely et al., 2008). A contrario, les benzodiazepines sont liées à une augmentation du risque de démence (Lagnaoui et al., 2002).

B. Anatomopathologie

Les caractéristiques anatomopathologiques de la MA permettent le diagnostic post-mortem de la maladie et se caractérisent par des plaques beta amyloïdes (appelées plaques séniles) constituées de peptides A β générés par clivage protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP), une tauopathie responsable des dégénérescences neurofibrillaires contenant la protéine Tau anormalement phosphorylée, et d'une neurodégénérescence progressive.

1) Les plaques β -amyloïdes

Ces plaques correspondent à l'accumulation extracellulaire du peptide β -amyloïde (figure 2). Ce peptide est formé par clivage anormale d'une glycoprotéine membranaire : l'APP. Ce peptide est insoluble et va former des agrégats sphériques.

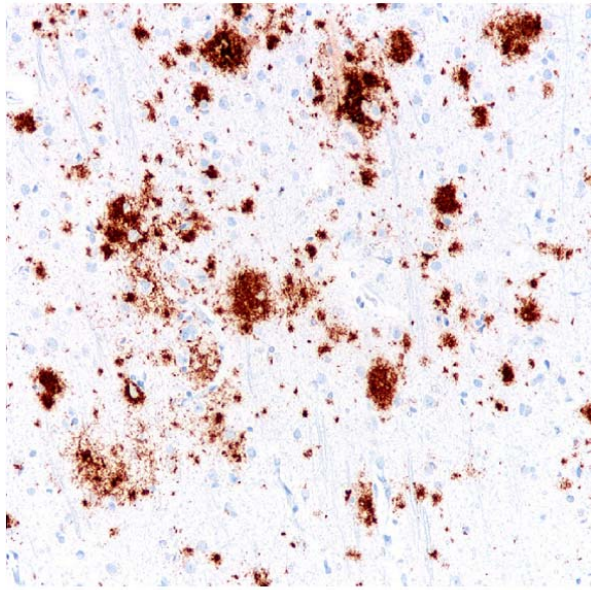


Figure 2 : Immunohistochimie de plaques séniles marquées par un anticorps anti A β dans le cortex cérébral (Castellani et al., 2010)

La fonction primaire de l'APP n'est pas connue, malgré tout, on sait que cette protéine serait impliquée comme régulateur de la formation synaptique (Priller et al., 2006), dans la plasticité neuronale (Turner et al., 2003), et l'export de fer (Duce et al., 2010).

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire qui peut subir des clivages successifs par l'intermédiaire d'enzymes appelées sécrétases α , β , γ .

Le premier clivage de l'APP est important car en fonction de la sécrétase, 2 voies sont possibles : une voie dite non-amyloïdogène qui est majoritaire et l'autre dite amyloïdogène conduisant à la formation du peptide A β (figure 3). La voie non-amyloïdogène est empruntée lorsque l' α -sécrétase clive en premier l'APP, libérant un gros fragment N-terminal du côté extracellulaire (sAPP α) et un petit fragment de 83 acides aminés (C83) qui reste fixé à la membrane où il subit un second clivage par la γ -sécrétase relâchant un peptide p3 non toxique et un fragment nommé AICD (*APP-intracellular C-terminal domain*) qui sont des facteurs de transcription (Lee and Ryu, 2010). La voie amyloïde se poursuit, si le premier clivage s'effectue par la β -sécrétase. Ce clivage va libérer un gros fragment N-terminal dans le milieu extracellulaire (sAPP β). Le fragment C-terminal (C99) restant, subit un second clivage opéré par la γ -sécrétase et conduisant à la libération du peptide A β du côté extracellulaire et du fragment AICD.

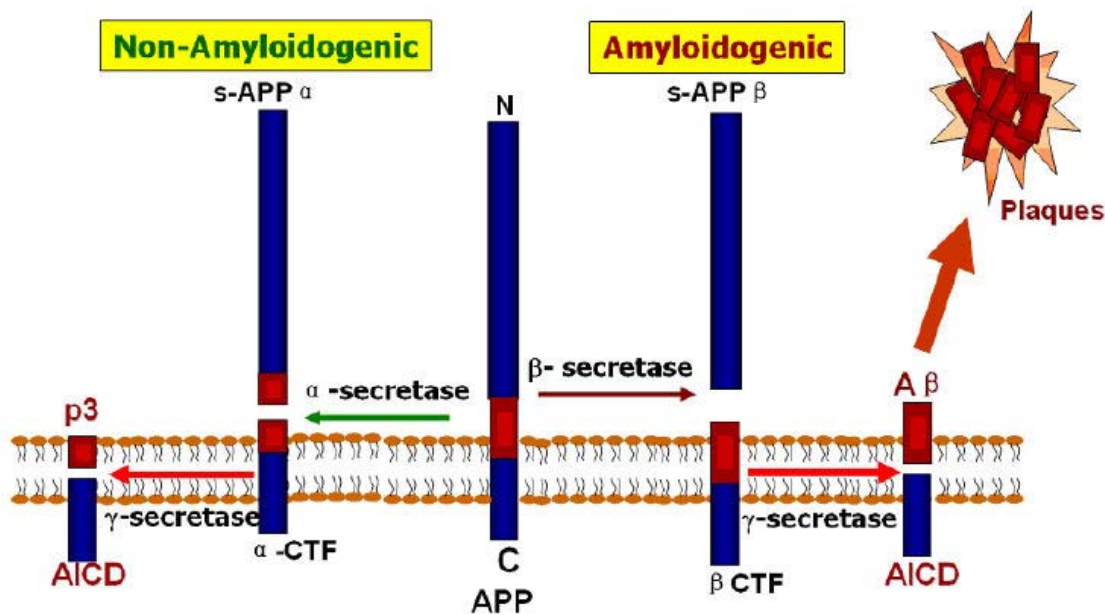


Figure 3 : Représentation schématique de la voie de maturation de l'APP. Le clivage de l'APP peut suivre 2 voies différentes, par l' α ou la β -secretase correspondant aux voies non-amyloïdogène et amyloïdogène. (Zhang and Saunders, 2007)

Le clivage par la γ -sécrétase peut se faire sur 3 sites différents (nommés ϵ , ζ et γ), mais seul le site γ peut conduire au peptide $A\beta$. La coupure γ conduit à la formation de 3 fragments en fonction de l'endroit où elle clive les acides aminés. Ainsi, le clivage au niveau des acides aminés 38, 40 ou 42 (numérotés à partir de l'extrémité N-terminale du fragment $A\beta$) vont former les peptides $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ respectivement. En conditions physiologiques, la forme majoritaire est le fragment $A\beta_{1-40}$ alors que la forme $A\beta_{1-42}$ ne représente qu'une faible proportion de fragments $A\beta$. Par contre, en condition pathologique, le peptide $A\beta_{1-42}$ est la forme la plus retrouvée (LaFerla et al., 2007).

2) Les dégénérescences neurofibrillaires

La protéine tau est une protéine associée aux microtubules qui favorise leur polymérisation et leur stabilité, essentielle à un transport axonal correct.

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) (figure 3) correspond à l'accumulation intraneuronale des protéines tau sous forme de filaments pathologiques, les PHF (Paired Helical Filaments). Les PHF sont constituées d'un triplet de protéines tau anormalement phosphorylées, nommées "Tau 60, 64, 69" (correspondant à leur masse moléculaire en kDa) ou PHF-Tau (Delacourte et al., 2002).

Cette hyperphosphorylation anormale entraîne une dépolymérisation des microtubules, ce qui perturbe fortement le trafic intracellulaire et entraîne la mort du neurone (Schindowski et al., 2008).

Il a été montré que la neurotoxicité $A\beta$ accélère la DNF et provoque son extension dans les régions néocorticales (LaFerla et al., 2007).

La DNF envahit les aires néocorticales selon un chemin précis, séquentiel, hiérarchique. Les déficits cognitifs sont observés quand l'hippocampe, le cortex temporal ainsi que les régions associatives sont affectés par ces DNF (Delacourte et al., 2002).

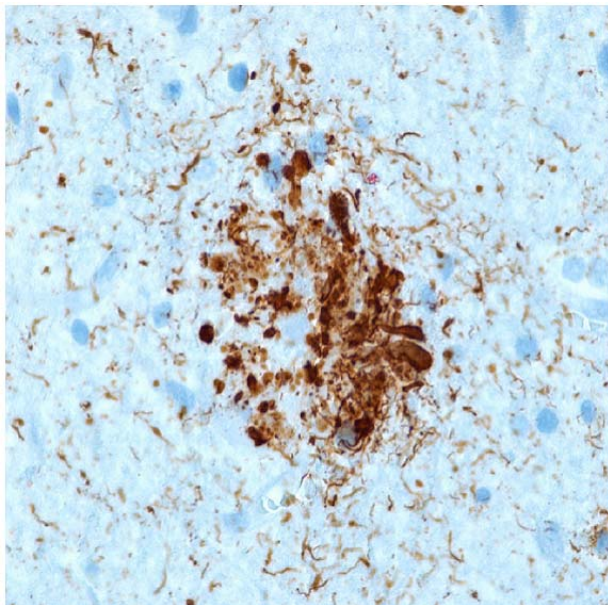


Figure 3 : immunohistochimie marquée par un anticorps dirigé contre la protéine tau hyperphosphorylée (reconnaissant la phosphorylation des résidus 202 et 205) dans une plaque sénile. (Castellani et al., 2010)

V. Structures cérébrales impliquées dans la mémoire, importance de l'hippocampe

Toute atteinte lésionnelle de l'hippocampe va entraîner une amnésie antérograde. Les fonctions de l'hippocampe ont pu être déterminées grâce notamment au célèbre patient H.M (Scoville and Milner, 1957). Après une commotion cérébrale à l'âge de 9 ans, le patient H.M. souffre de crises d'épilepsie qui ne répondent pas à la médication de l'époque. En 1953, à l'âge de 27 ans, il subit une intervention chirurgicale dans le but d'extraire les régions du cortex générant les crises d'épilepsie. On lui enlève les deux lobes corticaux temporaux médians, c'est-à-dire l'hippocampe et les aires avoisinantes. Les crises cessèrent, mais l'opération fut à l'origine d'une sévère amnésie antérograde : H.M. avait un souvenir intact des épisodes de sa jeunesse, mais était incapable d'accumuler le moindre nouveau souvenir à long terme. Le visage des gens, ses propres faits et gestes, tout disparaissait en quelques minutes, confirmant le rôle majeur de l'hippocampe pour l'acquisition et l'encodage de nouveaux souvenirs dans notre mémoire à long terme (Scoville and Milner, 1957 ; Milner, 1998 ; Squire, 2009).

On peut néanmoins noter que les souvenirs des épisodes anciens de la vie de H.M., ses connaissances générales ainsi que sa mémoire à court terme et sa mémoire implicite n'ont pas été affecté par l'ablation de l'hippocampe. Ainsi, de nombreux tests (problème des tours de Hanoï, test de dessin vu à travers un miroir...) ont permis de montrer que H.M. pouvait apprendre de nouvelles aptitudes même s'il ne se souvenait pas d'avoir effectué une tâche pourtant longtemps pratiquée. En effet, dans ces tests, H.M. s'améliore au fil des jours même s'il a l'impression à chaque jour de faire le test pour la première fois. Cela montre que malgré son amnésie, certains apprentissages procéduraux lui sont encore possibles (Squire, 2009).

Ce phénomène a permis de comprendre que l'hippocampe et les régions corticales avoisinantes ne semblaient pas être impliqués dans le stockage de l'information, mais seulement dans son encodage. En effet, l'hippocampe reçoit des connexions des aires corticales sensorielles primaires, et des cortex rhinal et entorhinal (figure 4). Alors que ces connexions dites antérogrades convergent vers l'hippocampe, d'autres voies rétrogrades le quittent et retournent vers les cortex primaires pour y fixer dans les synapses corticales les associations facilitées par l'hippocampe (Alvarez and Squire, 1994).

Ainsi, il a été démontré que le cortex temporal, qui est une aire sensorielle primaire pour l'audition et la vision, jouait un rôle important dans le stockage de l'information (Lah and Miller, 2008). En effet, d'autres patients ayant subi des dommages à l'ensemble des lobes

temporaux, mais dont la région de l'hippocampe avait été préservée, souffraient exactement du syndrome inverse de H.M. : un meilleur souvenir des choses apprises récemment au détriment des souvenirs d'enfance (amnésie rétrograde). Les souvenirs encodés depuis longtemps dans la mémoire à long terme peuvent donc se passer de l'hippocampe. C'est en particulier le cas des connaissances générales de la mémoire sémantique qui activent plutôt le cortex frontal et le cortex temporal (Lah and Miller, 2008).

Les théories actuelles sur les structures cérébrales impliquées dans la mémoire postulent donc que l'hippocampe et le cortex fronto-temporal jouent des rôles distincts mais complémentaires dans l'acquisition et le stockage de l'information.

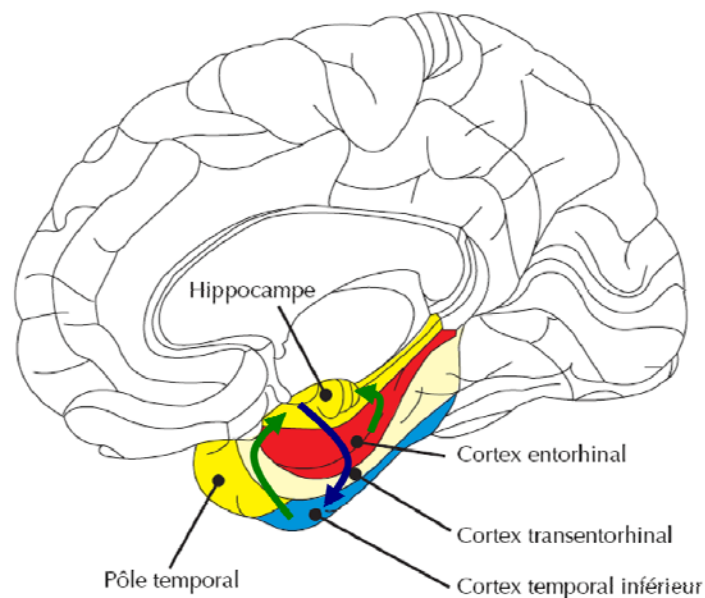


Figure 4 : Coupe de cerveau (adapté de www.ccr.fr/sites/alzheimer/fr/maladie.htm)
Connexions entre hippocampe, cortex entorhinal et cortex temporal

- Connexions afférentes (ou antérogrades) à l'hippocampe
- Connexions efférentes (ou rétrogrades) à l'hippocampe

Il est intéressant de noter que la mémoire spatiale, contrairement à d'autres mémoires, demeurerait confinée à l'hippocampe et plus précisément à l'hippocampe dorsal (Fanselow and Dong, 2010). Ainsi, cette atteinte des neurones de l'hippocampe rencontré dans la maladie d'Alzheimer va être impliquée dans les troubles de la mémoire à long terme et notamment de la mémoire spatiale.

A l'inverse certaines mémoires requièrent l'activation de plusieurs zones du cerveau. Ainsi, la mémoire émotive mettant en jeu certains souvenirs personnels très intenses,

impliqueraient non seulement l'hippocampe mais également l'amygdale, une région déjà reconnue pour gérer nos réactions de peur (McDonald et al., 2007).

Enfin, d'autres mémoires comme la mémoire procédurale, celle du " savoir faire " comme faire de la bicyclette par exemple, ne solliciterait pas du tout l'hippocampe. Elle serait plutôt associée à des modifications dans le cervelet, les ganglions de la base et le cortex moteur, des régions justement impliquées dans le contrôle de la motricité. D'ailleurs, la mémoire procédurale n'est pas touchée par l'amnésie liée aux lésions de l'hippocampe mais elle est affectée par des dommages au cervelet et des maladies neurodégénératives comme celle de Huntington qui altèrent les ganglions de la base (Aylward et al., 1997).

Ainsi, l'hippocampe, les lobes temporaux, de même que les structures du système limbique qui leur sont reliées, vont tous jouer à leur manière un rôle dans la consolidation de la mémoire à long terme.

VI. Modèle de rats cérébro-lésés

Lors de cette thèse, nous avons souhaité étudier les mécanismes moléculaires de l'hippocampe impliqués dans les processus de mémorisation à long terme et savoir si ces mécanismes étaient atteints dans la maladie d'Alzheimer. Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer permettent de reproduire certaines caractéristiques anatomopathologiques de la pathologie (e.g. plaques amyloïdes, tauopathie), mais présentent certaines limites car ils ne reproduisent que partiellement la progression, la sévérité ainsi que les différents déficits mnésiques de la MA (Cassel et al., 2008). Ces problèmes de reproductibilité des troubles de la mémoire peuvent s'expliquer, dans ces modèles, par l'absence de dégénérescences neuronales marquées de la voie cholinergique du cerveau basal antérieur et du cortex entorhinal, qui sont impliquées dans le déclin cognitif de la MA (Cassel et al., 2008). Ainsi, ces modèles ne sont pas les plus adaptés pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les troubles mnésiques de la MA.

L'hypothèse de l'atteinte cholinergique du cerveau basal antérieur pour expliquer les troubles cognitifs de la MA a été émise il y a plus de 30 ans (Bartus, 2000 ; Bartus et al., 1982, Perry et al., 1978). C'est d'ailleurs sur cette caractéristique que se base les thérapies actuelles, avec l'utilisation d'anticholinestérasique comme le donépézil (Aricept[®]), la galantamine (Rémintyl[®]), ou encore la rivastigmine (Exelon[®]), pour traiter les symptômes mnésiques de la MA. Cependant, à elle seule, la reproduction de cette lésion neurologique dans le cerveau basal antérieur ne permet pas de rendre compte de ces troubles mnésiques (pour revue : Parent and Baxter, 2004 ; Dornan et al., 1997 ; Torres et al., 1994 ; Wenk et al., 1994), notamment chez le rat, bien que de telles lésions ont montré qu'elles induisaient des troubles de l'attention (Baxter et al., 1997 ; Chiba et al., 1995 ; McGaughy et al., 1996 ; Wenk, 1997). De plus, les patients souffrant de *mild cognitive impairment* (MCI) (Bennet et al., 2005) ou même de maladie d'Alzheimer modérée ne présentent pas de diminution des marqueurs cholinergiques dans le cortex (Davis et al., 1999 ; Dekosky et al., 2002 ; Frolich, 2002 ; Terry and Buccafusco, 2003).

Finalement, la première dégénérescence liée à la MA n'apparaît pas dans le cerveau basal antérieur mais dans le cortex entorhinal (Palmer et al., 2002 ; Pennanen et al., 2004). Les processus dégénératifs du cortex entorhinal peuvent même être considérés comme des signes précoces de la MA (Gomez-Isla et al., 1996, Pennanen et al., 2004, Stoub et al., 2005), sont des bons marqueurs prédictifs de la conversion MCI à MA (deToledo-Morrell et al.,

2004) et sont une cause potentiellement importante des troubles de la mémoire (Du et al., 2001, 2003 ; Rodrigue and Raz, 2004). Cependant, chez les rongeurs, les lésions du cortex entorhinal induisent généralement des effets mineurs sur la performance mnésique, particulièrement sur les tâches spatiales (Bannerman et al., 2001).

Mais il semblerait que la localisation des lésions dans le cortex entorhinal joue un rôle important en effet Steffenach et al., 2005 ont montré que les lésions empiétant sur la bande dorsolaterale du cortex entorhinal, contrairement à plusieurs lésions réalisées précédemment qui empiétaient sur le cortex entorhinal ventral, sont capables d'altérer l'apprentissage spatial.

Comme il existe de nombreux éléments en faveur d'une dégénérescence non seulement cholinergique mais également des dommages du cortex entorhinal des patients MA, il semble raisonnable d'imaginer que ces 2 altérations peuvent conjointement et même participer en synergie aux dysfonctions mnésiques.

Ce sont sur ces deux profils neurodégénératifs observés au cours de la MA que le laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives (Pr. JC Cassel, UMR CNRS-UDS 7237) a récemment développé un modèle de rat qui, à la suite de ces deux lésions, présentent de graves défauts de mémorisation (Traissard et al., 2007).

Plus précisément, les lésions ont été réalisées en 2 temps, à 7 jours d'intervalle, la première lésion consiste en un endommagement du cortex entorhinal à l'aide de plusieurs injections de N-méthyl-D-aspartate (un analogue du glutamate). De telles lésions détruisent les neurones du cortex entorhinal, sans toucher aux fibres en passage dans cette structure. La seconde correspond à des lésions sélectives des neurones cholinergiques de la base du cerveau antérieur qui sont obtenues par l'injection intra septum d'une immunotoxine, la 192 IgG-saporine (constituée d'un anticorps dirigé contre le récepteur à basse affinité du NGF, à savoir le p75NGF, couplé à une toxine ribosomale).

Deux groupes d'animaux ont été réalisés : un groupe de rats qui correspond à nos rats contrôles, ces rats ont reçu une solution saline en lieu et place des toxines (rats *Sham*) et un groupe de rats qui a les 2 types de lésions (rats *Lesion*).

Lorsque les deux types de lésions sont réalisés en combinaison, les déficits mnésiques sont tels que les rats s'avèrent incapables d'apprendre certaines des tâches auxquelles ils sont soumis, tel que le test d'apprentissage spatial en piscine de Morris (Traissard et al., 2007).

VII. Les mécanismes transcriptionnels sont impliqués dans la mémorisation

La mémoire à court terme va permettre un enregistrement temporaire des événements. D'un point de vue moléculaire, cet enregistrement s'effectue grâce aux protéines présentes dans les neurones et qui sont suffisantes pour assurer le mécanisme de mémoire à court terme.

Le passage de l'information de la mémoire à court terme vers la mémoire à long terme, permettant un rappel de l'information des jours, des mois ou des années plus tard, nécessite un encodage de l'information, une consolidation de l'information dans la mémoire. Ce passage vers la mémoire à long terme requiert, d'un point de vue moléculaire, la synthèse de protéines spécifiques c'est-à-dire la mise en place d'un programme transcriptionnel et une traduction des ARN nouvellement transcrits en protéines. Ces protéines spécifiques vont être impliquées dans les processus de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme, ou encore dans la formation d'épines dendritiques qui sont des mécanismes indispensables à la formation de la mémoire (Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005; Medina et al., 2008).

A. Régulation de la transcription

La régulation de la transcription dépend de l'activité des facteurs de transcription et des mécanismes dits épigénétiques.

1) Les facteurs de transcription

Un facteur de transcription est une protéine qui se lie à une séquence spécifique de l'ADN (*DNA binding domains DBD*) et qui intervient dans la transcription de l'ADN en ARN. Les facteurs de transcription peuvent agir seul ou avec d'autres protéines et former alors des complexes. Ils peuvent activer ou réprimer le recrutement des ARN polymérases sur les gènes. Les facteurs de transcription se caractérisent par un ou plusieurs sites de liaison à l'ADN, lesquels s'attachent au promoteur des gènes qu'ils régulent.

Exemple du facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding*).

CREB est une protéine ubiquitaire qui interagit directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse, dits séquences *CRE* pour *cAMP response element*. Le *CRE*,

un palindrome de 8 paires de bases « TGACGTCA », est un élément de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc. Plusieurs voies de signalisations cellulaires peuvent mener à l'activation de CREB. Le facteur commun étant l'AMPc qui va mener au final à la phosphorylation de CREB, qui permet son activation (Kwok et al., 1994). En général, un signal extracellulaire arrive à la surface de la cellule (une hormone, un neurotransmetteur) et active des récepteurs spécifiques (voir « Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mémorisation »). Ceux-ci permettent ensuite de générer un second messenger, l'AMPc qui va activer une protéine kinase PKA capable de phosphoryler la sérine 133 de CREB située dans son domaine KID (pour *Kinase Inductible Domain*) pour finalement aboutir à son activation (Alberini, 2009). En effet, une inactivation du site de phosphorylation par mutation du gène de creb au niveau de la serine 133 abolit complètement l'activité transcriptionnelle de CREB (Gonzalez and Montminy, 1989).

Ce facteur de transcription est particulièrement intéressant car il est impliqué dans de nombreux fonctionnements importants du système nerveux, incluant la neurogénèse, la survie neuronale, la neuroprotection, la régénération, le développement axonal, la plasticité synaptique, la formation de la mémoire ou encore la potentialisation à long terme (Carlezon et al., 2005; Dragunow, 2004; Mioduszevska et al., 2003; Montminy et al., 2004; Persengiev and Green, 2003; Silva et al., 1998). Par exemple, une surexpression de la forme active de CREB va faciliter dans l'hippocampe l'induction de la potentialisation à long terme (Barco et al., 2005).

Les facteurs de transcription utilisent une variété de mécanismes pour réguler la transcription des gènes (Gill, 2001). Ces mécanismes comprennent la stabilisation ou le blocage de la liaison de l'ARN polymérase sur l'ADN, le recrutement de protéines co-activatrices ou co-répressives (Xu et al., 1999) et la catalyse de l'acétylation ou de la déacétylation des protéines histones (voir « Mécanismes épigénétiques »). En effet, les facteurs de transcription peuvent recruter des protéines avec cette activité catalytique. Plus spécifiquement, les facteurs de transcription recrutent l'un ou l'autre de ces 2 mécanismes opposés afin de réguler la transcription (Narlikar et al., 2002) : l'activité histone acétyltransférase qui permet l'acétylation des protéines histones et l'activité histone déacétylase qui permet la déacétylation des protéines histones.

En effet dans l'exemple du facteur de transcription CREB, une fois activée, l'isoforme CREB1 recrute la *CREB binding protein* (CBP), à qui elle a donné son nom, qui a d'un côté une fonction histone acétyl transférase (HAT) qui va acétyler les histones et d'un autre côté

par sa fonction co-activateur, activer la transcription. Par contre l'isoforme CREB2 recrute HDAC5 qui va déacétyler les histones (Guan et al., 2002).

2) Les mécanismes épigénétiques

Afin de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques, il convient de connaître comment s'organise la chromatine. Celle-ci correspond à un complexe d'ADN, d'histones et de protéines non-histone dans le noyau des cellules. Le génome des eucaryotes est compacté en chromatine dont l'unité fondamentale est le nucléosome. Chaque nucléosome comprend approximativement 146 paires de bases d'ADN enroulées autour de huit protéines histones constituant le cœur du nucléosome (chaque octamère contient 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4) (figure 5). H1 ne fait pas partie de l'octamère, il est situé entre deux nucléosomes et permet le maintien de la structure nucléosomale.

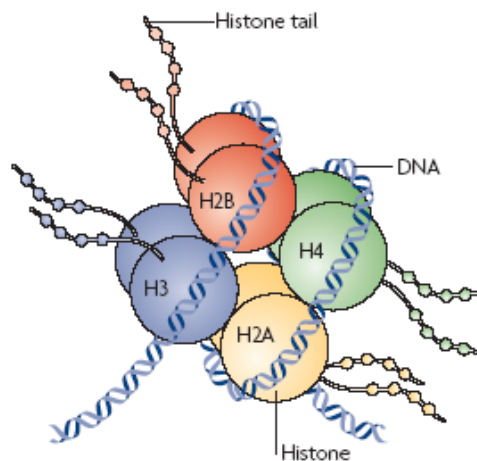


Figure 5 : Nucléosome

Ce dessin de nucléosome montre l'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones composé de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (d'après Levenson and Sweatt, 2005).

Les modifications épigénétiques qui influent sur les processus transcriptionnels peuvent porter sur l'ADN et sur les histones : l'ADN peut être méthylé et les histones peuvent être acétylées, phosphorylées, méthylées, ubiquitinylées ou sumoylées (Kouzarides, 2007 ; Berger, 2007). L'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la sumoylation surviennent sur les résidus lysines, alors que la méthylation peut se faire également sur les résidus arginine et les phosphorylations sur les résidus serine/thréonine (figure 6). Ces modifications vont permettre un changement conformationnel de la chromatine. Elles sont dites « épigénétiques » car elles modifient l'activité du gène de manière dynamique en modulant les interactions protéine-ADN, sans modifier les gènes en eux-mêmes.

Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN ne s'effectue que sur des résidus Cytosine précédant un résidu Guanine (CpG). Les dinucléotides CpG sont répartis de façon non uniforme dans le génome, avec une sous-représentation générale, mais une augmentation de la densité dans de courtes régions, appelées îlots CpG. Un îlot CpG est défini comme une région de 200 paires de bases d'ADN où les niveaux de GC dépassent 60% (Jones and Takai, 2001 ; McKay et al., 2004). La méthylation de l'ADN s'effectue grâce à des *DNA methyltransferases* (DNMT) qui vont transférer un méthyl de la S-adénosyl-Méthionine sur une cytosine (Wu and Santi, 1985 ; 1987 ; Bestor and Verdine, 1994). Les cytosines méthylées interfèrent avec des facteurs de transcriptions et la machinerie transcriptionnelle et sont généralement associées à une répression transcriptionnelle (Razin and Riggs, 1980). Les CpG méthylées sont reconnus par un motif protéique conservé, d'environ 70 acides aminés, appelé MBD (methyl-CpG binding domain). Les MBD vont recruter, au niveau des CpG méthylés, des complexes répresseurs et des histones déacétylases (HDAC) (Eden et al., 1998 ; Jones et al., 1998 ; Nan et al., 1998 ; Fuks et al., 2000 ; Rountree et al., 2000). Cette interaction particulière entre les CpG méthylées et des complexes co-répresseurs (et/ou co-activateurs) qui contiennent des enzymes capables de modifier les histones tels que les HDAC montre qu'il existe un lien entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

Il est intéressant de noter qu'un lien a été fait entre méthylation de l'ADN et MA. En effet, Yoshikai et collaborateurs considèrent l'APP comme un gène potentiellement contrôlé par méthylation (Yoshikai et al., 1990). Ils ont montré que la région promotrice de l'APP avait une forte proportion de GC (72%). West et al. (1995) ont trouvé une hypométhylation du gène de l'APP chez un patient MA par rapport à un patient contrôle normal et à un patient présentant un autre type de démence (maladie de Pick). Tohgi et al. (1999) ont également étudié les niveaux de méthylation de l'ADN extrait du cortex pariétal de cerveaux post-mortem de 10 individus neurologiquement normaux. Ils ont observé une diminution des taux de méthylcytosine au niveau du promoteur de l'APP avec l'augmentation de l'âge (un facteur de risque connu de la MA). De manière plus générale, une étude utilisant des techniques d'immunohistochimie sur des cerveaux post-mortem de patients MA, a montré que l'immuno-réactivité des cytosines méthylées, et de DNMT1 entre autre, était diminuée chez les patients MA et ces résultats renforcent l'argument d'une perte de méthylation de l'APP dans la MA (Mastroeni et al., 2008).

Modifications des histones

Les histones jouent des rôles structuraux et fonctionnels dans tous les processus nucléaires. Les principales modifications post-traductionnelles qu'elles peuvent subir sont des acétylations, des méthylations et des phosphorylations au niveau de leurs extrémités N-terminale (figure 6).

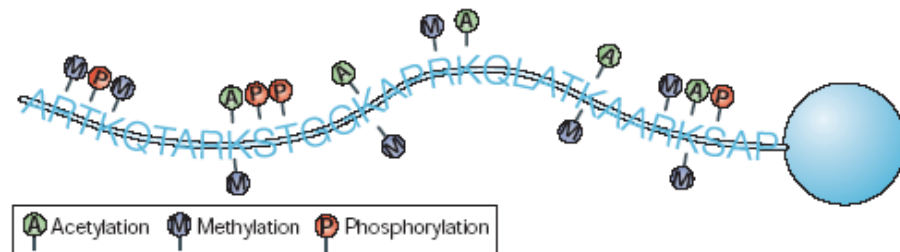


Figure 6 : Représentation des 30 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 chez l'homme (Levenson and Sweatt, 2005)

Plusieurs sites de l'extrémité N-terminale sont les cibles du marquage épigénétique, ces sites peuvent être par exemple acétylés, phosphorylés et méthylés.

Dans la forme native, la chromatine est fortement condensée, grâce aux interactions extrêmement résistantes des histones chargées positivement, avec l'ADN chargé négativement. Cette conformation maintient un état répressif de la transcription. Pour initier la transcription, les interactions ADN-histones doivent être « rompues ». Différentes modifications post-traductionnelles des histones et plus particulièrement l'acétylation des groupements aminés des résidus lysine par les histones acétyltransférases (HAT) permettent de diminuer cette interaction. En effet l'acétylation (groupement négatif) va neutraliser les charges positives des histones, et donc affaiblir l'interaction des histones avec l'ADN, ainsi les HAT vont permettre une ouverture de l'ADN (figure 7). Une telle conformation va permettre à la machinerie transcriptionnelle (ex : ARN polymérase II) d'accéder aux gènes. L'hyperacétylation est donc généralement associée à une activation transcriptionnelle. La déacétylation des histones effectuée par les histones déacétylases (HDAC) va au contraire entraîner une répression de l'activité transcriptionnelle (Mellor, 2006; Kouzarides, 2007).

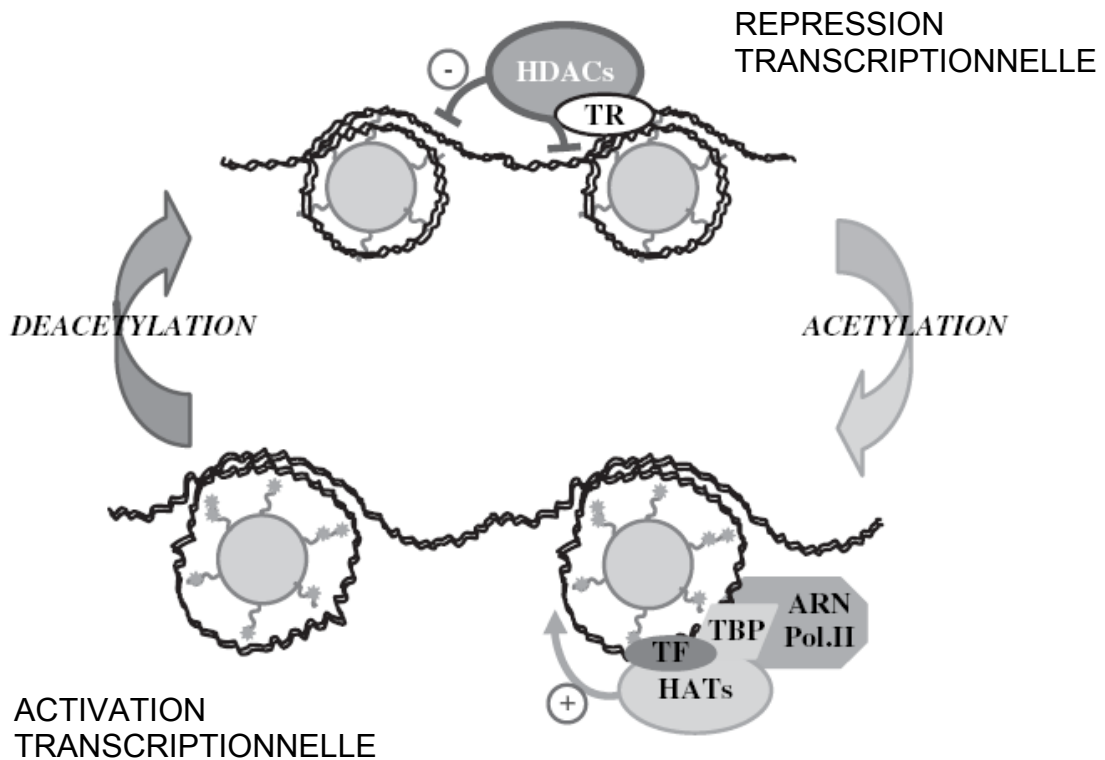


Figure 7 : Représentation des différents états d'acétylation de la chromatine (Anne-Laurence et al., 2007).

L'activation et la répression transcriptionnelles sont liées à l'état d'acétylation des histones.

TBP : TATA-Binding Protein

TF : Transcription Factor

TR : Transcriptional Repressor

Les méthylations et les phosphorylations, quand à elles, n'entraînent pas les mêmes conséquences (répression ou activation transcriptionnelle) en fonction de leur emplacement sur les lysines des différentes histones.

Ces mécanismes de remodelage de la chromatine permettent à l'ADN d'être accessible ou non à la machinerie transcriptionnelle de manière dynamique.

B. Acétylation des histones et mémoire

Nous nous sommes intéressés à l'acétylation des histones, qui est associée à une activation transcriptionnelle (processus indispensable à la formation de la mémoire à long terme), car elle a montré qu'elle participait à la formation et à la consolidation de la mémoire, ainsi qu'à la plasticité synaptique (Graff and Mansuy, 2008).

L'étude initiale qui a montré le rôle des mécanismes épigénétiques et notamment des acétylations dans la formation de la mémoire a utilisé le mollusque marin *Aplysia* (Guan et al., 2002). L'exposition des animaux à un traitement connu pour induire la facilitation à long terme permet d'augmenter l'acétylation de H3 et H4 au niveau du promoteur de *C/EBP* (Guan et al., 2002) qui est un gène connu pour être rapidement induit durant la formation de la facilitation à long terme (Alberini et al., 1994).

La première publication à avoir montré réellement une régulation des acétylations dans la formation de la mémoire a été réalisée au laboratoire de J. David Sweatt (Levenson et al., 2004). Dans cette étude les histones H3, mais pas les histones H4, étaient hyperacétylés dans la région CA1 de l'hippocampe de rats après un apprentissage de conditionnement à la peur dépendant du contexte (*contextual fear conditioning*). De même, Lubin et al. (2008) ont montré dans l'hippocampe que les niveaux de l'histone H3 acétylée et de l'histone H3 phosphoacétylée étaient augmentés au niveau du promoteur IV du *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) après un conditionnement à la peur.

On peut noter également que chez des souris wild-type élevées dans un environnement enrichi (enrichissement sensoriel : nombreux jeux et enrichissement social : nombreux congénères dans la cage) pendant 2 semaines permet d'améliorer la mémoire de ces souris, lesquelles présentent une augmentation de l'acétylation des histones (H3 et H4) dans l'hippocampe et le cortex (Fischer et al., 2007). Plus récemment, Fischer a montré, chez des souris, que le vieillissement physiologique qui est associé à des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire, est corrélé à une dérégulation des acétylations dans l'hippocampe et notamment à une baisse de l'acétylation de l'histone H4 de la lysine 12 (Peleg et al., 2010).

Ces données indiquent le rôle important que semble jouer les acétylations des histones, c'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux acétylations des histones qui vont favoriser l'expression des gènes et notamment de gènes impliqués dans les processus de mémorisation (Levenson and Sweatt, 2006).

Les acétylations sont régulées grâce à la balance des histones acétyltransférases et des histones déacétylases. Ainsi des agents pharmacologiques capables de les moduler permettraient d'agir sur ces acétylations et ainsi d'améliorer les processus de mémorisation. Ce point intéressant est développé dans les « perspectives thérapeutiques ».

C. Histones acétyl transférases (HAT)

1) Les différentes familles de HAT

On attribue deux grandes fonctions aux histones acétyltransférases (HATs) : leur activité enzymatique acétyltransférase, et leur capacité à former des complexes multi-protéiques (« molecular scaffolding ») en recrutant divers éléments de la machinerie transcriptionnelle.

Les HATs catalysent le transfert d'un résidu acétyl depuis le cofacteur acétylcoenzyme A sur les groupements ϵ -amines des résidus Lysines des histones (Roth et al., 2001 ; Hodawadekar and Marmorstein, 2007), c'est pourquoi elles sont également appelées KAT pour K(lysine) acétyltransférases (Allis et al., 2007). A noter qu'elles sont aussi capables d'acétyler des protéines non-histones telles que les facteurs de transcription (Lee and Workman, 2007).

A l'heure actuelle, six familles de HATs ont été décrites. Les regroupements sont basés sur les similarités de séquence entre différentes régions homologues et entre divers motifs relatifs aux domaines HAT (Sternier and Berger, 2000).

1) la superfamille GNAT (GCN5-related acetyltransferases), qui comprend notamment GCN5, PCAF (p300/CBP associated factor), ELP3 qui est une sous-unité du complexe élongateur, la sous-unité du complexe médiateur NUT1 (*Negative regulation of URS Two*), HPA2 (*Histone and other protein transferase*) et HAT1 (Neuwald and Landsman, 1997). A noter que HAT1 est la seule HAT à être cytoplasmique, en effet l'ensemble des HAT se retrouvent uniquement dans le noyau cellulaire. Historiquement, GCN5 fut la première HAT découverte chez le protozoaire *Tetrahymena* (Brownell et al., 1996) et très rapidement identifiée chez l'homme (Candau et al., 1996).

Les GNAT partagent plusieurs domaines fonctionnels, incluant la région N-terminale, un domaine acétyltransférase qui comprend des motifs conservés, une région qui interagit avec le coactivateur ADA2 (*transcriptional ADAptor*) et un bromodomaine C-terminal qui interagit avec les résidus lysine acétylée. La famille GNAT a un mécanisme catalytique

ternaire d'acétylation : la réaction n'implique pas la formation intermédiaire de l'enzyme acétylée de manière covalente, mais implique plutôt la formation d'un complexe ternaire (histones, acetyl-CoA et enzyme) où le groupe ϵ -amino des résidus lysines des histones se lie directement à l'acetyl-CoA et l'acétylation requiert la déprotonation du groupe ϵ -amino précédent l'attaque nucléophile (Tanner et al., 1999 ; Trievel et al., 1999). Les membres de la famille GNAT sont importants pour la régulation de la croissance et du développement cellulaire. Les souris knockouts GCN5L (*GCN5 yeast homolog like*) décèdent à un stade embryonnaire (Bu et al., 2007). GCN5 chez la levure est nécessaire pour le passage normal en mitose (G2-M) et pour l'expression de gènes mitotiques (Trievel et al., 1999).

PCAF (p300/CBP associated protein) fut initialement décrite comme interagissant avec les HATs CBP et p300, au niveau du site de fixation de l'oncoprotéine adénovirale E1A (Yang et al., 1996). PCAF possède aussi des propriétés d'autoacétylation et d'autoubiquitination. PCAF est présent dans un complexe stable de plusieurs sous-unités qui comprends plus de 20 polypeptides, qui ont des masses moléculaires qui vont de 10 à 400kDa (Ogryzko et al., 1998). PCAF joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle, l'arrêt du cycle cellulaire, et la différenciation cellulaire des cellules en culture. Les souris PCAF knockout présentent des troubles de la mémoire à court et long terme (Maurice et al., 2008). Les acetyltransférases GCN5-like (GCN5 et PCAF) ont été identifiés comme des composants de complexes type SAGA (SPT (SuPressor of Ty)-ADA-GCN5-acetyltransférase) comme par exemple le complexe STAGA (SPT3-TAF9-GCN5/PCAF). De plus, le complexe ATAC (Ada Two A Containing) présente également GCN5 et PCAF (Wang et al., 2008). Le complexe humain ATAC est très proche du complexe STAGA, à l'exception de nouvelles acétyltransférases identifiées qui ont une spécificité H4K16 (Suganuma et al., 2008). Il est intéressant de noter que les complexes E1A-CBP/p300 et PCAF-CBP/p300 ont des effets opposés sur le cycle cellulaire : E1A a des activités mitogènes alors que PCAF bloquerait la progression du cycle cellulaire (Yang et al., 1996). De même que PCAF, GCN5 est capable d'interagir avec CBP/p300 (Yang et al., 1996), et toutes deux sont retrouvées au sein de complexes protéiques très conservés au cours de l'évolution (Sternier and Berger, 2000). Si PCAF et GCN5 sont exprimées de façon ubiquitaire, il est intéressant de noter que leurs taux d'expressions respectifs diffèrent d'un tissu à l'autre (Xu et al., 1998), suggérant qu'elles pourraient avoir des fonctions propres.

ELP3 est une autre acétyltransférase qui est membre de la superfamille des GCN5-like. L'allongement et la forme hyperphosphorylée de la RNA polymérase II sont associés au complexe élongateur (*Elongator complex*) qui a l'histone acétyltransférase ELP3 comme sous-unité (Winkler et al., 2002 ; Wittschieben et al., 1999). L'activité du complexe élongateur est diminuée chez les patients souffrant de dysautonomie familiale, une maladie génétique neurodéveloppementale appartenant aux neuropathies autonomes sensorielles héréditaires (Slaugenhaupt et al., 2001). Récemment, il a été montré que ELP3 permettait l'acétylation de l'alpha-tubuline des microtubules, participant ainsi à la maturation des projections des neurones corticaux (Creppe et al., 2009). L'acétylation de l'alpha-tubuline des microtubules est un processus biologique fondamental qui régule le transport de nombreuses protéines ou organelles dans les neurones (Reed et al., 2006). Ce mécanisme est régulé négativement par l'histone déacétylase 6 (HDAC6) cytoplasmique et la sirtuin 2 (SIRT2) (Zhang et al., 2003 ; Hubbert et al., 2002 ; Matsuyama et al., 2002). Il a été démontré que l'acétylation de l'alpha-tubulin affectait les neurones striataux et corticaux des patients atteints de la maladie de Huntington (Dompierre et al., 2007), les variants alléliques de ELP3 ont été, quand à eux, directement associés à la sclérose latérale amyotrophique (Simpson et al., 2009). Ces données récentes suggèrent que la régulation de l'acétylation des microtubules par l'elongateur et en particulier ELP3 peut être communément affectée dans différents désordres neurologiques et ainsi être une voie potentielle pour cibler les thérapies basées sur la modulation des acétylations (pour revue Nguyen et al., 2010).

- 2) la famille des MYST, ainsi baptisée d'après les noms de ses membres fondateurs (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60), elle comprend notamment les HATs Sas2 et Sas3 de *S. cerevisiae*, ainsi que Tip60, MOZ, MORF et HBO1 retrouvées chez l'homme. Sas2 et Sas3 sont directement reliées au « silencing » des gènes, une fonction dont elles tirent leur nom (something about silencing), mais jusqu'à présent aucun homologue de Sas2 et Sas3 n'a été mis en évidence chez les eucaryotes supérieurs. Tous les membres de cette famille contiennent une région commune d'environ 240 acides aminés avec un site canonique de liaison acetyl-CoA et un motif en doigt de zinc de type C2HC. De plus, ils possèdent aussi un chromodomaine impliqué dans les interactions protéine-protéine. Bien que les familles GNAT et MYST ne contiennent pas de séquences homologues, ils adoptent le même repli globulaire α/β contenant une région centrale structurellement superposable associée à une région liant le co-facteur acetyl-coenzymeA (Acetyl-CoA). Récemment, les membres de la famille MYST ont été impliqués dans la différenciation des cellules souches.

Querkopf (QKF, MORF, MYST4, KAT6B) et la protéine *monocytic leukemia zinc finger* (MOZ, MYST3, KAT6A) sont des protéines qui régulent la dynamique des cellules souches au niveau transcriptionnel (Voss et al., 2009). En clinique, les membres de la famille MYST sont les protéines de fusion les mieux caractérisées en lien à divers cancers (Avvakumov et al., 2007). Un des membres représentatifs les plus importants de la famille MYST est Tip60. Tip60 (Tat Interacting Protein, 60 kDa) fut la première HAT de la famille des MYST à avoir été découverte chez l'homme, en tant que protéine interagissant avec Tat (protéine transactivatrice du virus HIV-1) (Kamine et al., 1996). Son activité HAT fut mise en évidence deux ans plus tard (Kimura and Horikoshi, 1998). La protéine AICD, provenant de l'APP et libérée par l'action de la γ -secrétase, forme un complexe avec Tip60, le facteur de transcription Fe65, le facteur d'assemblage nucléaire SET et 14-3-3 γ (Cao and Sudhof, 2001, 2004 ; Sumioka et al., 2005 ; Telese et al., 2005). Ce complexe stimule l'acétylation des histones (Kim et al., 2004) et co-active les promoteurs des gènes qui sont liés à l'apoptose et à la neurotoxicité (Kinoshita et al., 2002). D'autre part, la protéine Tip60 est présente dans le complexe NuA4 et est impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN et est donc impliquée dans les cancers (Squatrito et al., 2006). Tip60 est également essentiel pour la survie cellulaire durant la transition blastocyste-gastrula de l'embryogénèse (Hu et al., 2009). MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) quant à elle est impliquée, avec CBP, dans la transformation oncogénique conduisant à la leucémie myéloïde (Borrow et al., 1996 ; Katsumoto et al., 2008 ; Kitabayashi et al., 2001).

- 3) la famille p300/CBP (CREB Binding Protein) ne comprend que ces deux membres, exprimés de manière ubiquitaire et impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Giordano and Avantaggiati, 1999; Goodman and Smolik, 2000). Elles ont des structures similaires comprenant 5 domaines d'interactions protéiques : le *nuclear receptor interaction domain* (RID), le domaine d'interaction de CREB et MYB, les régions cystéine/histidine (CH1 et CH3) et l'*interferon response-binding domain* (IBiD). De plus p300 et CBP possèdent un domaine acétyltransférase, un bromodomaine qui lie les lysines acétylées et un *plant homeodomain* (PHD) avec un motif doigt de zinc. Ce dernier (acides aminés 1237-1311) a montré qu'il représentait l'intégralité du domaine enzymatique acétyltransférase de CBP (Bordoli et al., 2001 ; Kalkhoven et al., 2002). Le mécanisme de Theorell-Chance a été proposé comme mécanisme d'action de l'enzyme. Dans ce mécanisme, les substrats se lient dans un certain ordre, mais ne forment pas de complexe ternaire (Liu et al., 2008).

P300 et CBP ont montré récemment des propriétés d'ubiquitination de p53, spécifiquement dans le compartiment cytoplasmique (Grossman et al., 2003 ; Shi et al., 2009). CBP et p300 sont impliqués dans la fermeture du tube neural (Bhattacharjee et al., 2009), et elles sont toutes les 2 critiques pour le développement embryonnaire, ainsi les souris manquant complètement de CBP ou p300 meurent à un stade embryonnaire précoce (Oike et al., 1999 ; Yao et al., 1998). On peut noter que le domaine HAT de CBP/p300 ne montre aucune homologie avec les autres HAT. Le premier processus cellulaire de CBP/p300 à avoir été identifié est le mécanisme de coactivateur transcriptionnel. Les événements de la signalisation associés à l'AMPc entraîne l'activation de la protéine kinase A (Chrivia et al., 1993). La phosphorylation de CBP/p300 par la PKA est considérée comme un événement important dans l'activation de l'acétyltransférase qui mène à l'expression des gènes. Bien que souvent associées dans la littérature, CBP et p300 semblent avoir malgré tout dans certains cas des fonctions distinctes (Kalkhoven, 2004). Elles interagissent avec de nombreux promoteurs de manière directe ou par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que CREB (Cyclic AMP Responsive Element Binding protein), les récepteurs nucléaires hormonaux, ou encore les activateurs relatifs aux oncoprotéines telles que c-Fos, c-Jun ou c-Myb. La nécessité de leur activité HAT dans l'activation transcriptionnelle a été mis en évidence in vivo (Korzus et al., 1998; Martinez-Balbas et al., 1998). Par ailleurs, G Pelletier et collaborateurs ont montré le rôle de l'activité HAT de CBP au sein du complexe de l'ARN polymérase I, soulignant la participation de CBP à l'activation de la transcription des gènes encodant les ARN ribosomiques (ARNr) (Pelletier et al., 2000).

Les publications récentes suggèrent le rôle important de p300/CBP dans la formation de la mémoire (Barrett and Wood 2008) et la perte de l'activité acétyltransférase a montré un lien causal vis-à-vis de nombreuses maladies neurodégénératives (Rouaux et al., 2004 ; Saha and Pahan, 2006). Leur rôle dans les cancers fait débat (Dekker and Haisma, 2009 ; Yang 2004). L'activité HAT de p300/CBP est importante pour la phase de transition G1/S (Ait-Si-Ali et al., 2000) et dans le cancer humain (Lyer et al., 2007).

Un membre de la famille a récemment été ajouté, il s'agit de Rtt109, qui acétyle H3K56, mais ne partage aucune homologie de séquence avec d'autres acétyltransférases (Tang et al., 2008).

- 4) la famille des coactivateurs de récepteurs nucléaires se compose chez l'homme des protéines SRC1 (Steroid receptor coactivator 1) et SRC3 (Steroid receptor coactivator 3, ou ACTR). La fonction de co-activateur transcriptionnel de SRC1 a été initialement mise

en évidence dans des cellules de mammifère : la protéine est capable de stimuler l'activation transcriptionnelle des complexes ligands/récepteurs nucléaires tels que les récepteurs à la progestérone, aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes, à la thyroïde et au rétinol X (Onate et al., 1995). Son activité HAT fut quant à elle établie en 1997 (Spencer et al., 1997). SRC3 est également capable d'interagir avec des récepteurs nucléaires, de stimuler la transactivation de gènes cibles et d'acétyler les histones (Chen et al., 1997).

- 5) TAF_{II}250 (TBP (TATA-Binding Protein)- Associated Factor II 250) est une HAT associée au complexe transcriptionnel TFIID. A noter, les complexes TFIIA, TFIIB, TFIIE et TFIIF, TFIID sont nécessaires à la formation du complexe de préinitiation de la transcription, permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (Burley and Roeder, 1996; Hampsey, 1998). En 1996, CA Mizzen et collaborateurs mirent en évidence l'activité HAT de TAFII250 (Mizzen et al., 1996). Cette activité HAT permettrait de faciliter la liaison des TBP sur la TATA box et la formation du complexe de préinitiation (Godde et al., 1995; Imbalzano et al., 1994).
- 6) Les sous-unités de TFIIC : TFIIC90 et TFIIC110 possèdent aussi des activités HAT (Hsieh et al., 1999; Kundu et al., 1999). Il est intéressant de noter que dans ce cas précis, il s'agit de permettre la synthèse d'ARN de transfert (ARNt) puisque TFIIC est un facteur de transcription général associé à l'ARN polymérase III (Lassar et al., 1983). Les ARN polymérases I et II semblent quant à elles associées davantage aux activités HAT de CBP (Pelletier et al., 2000) et de TAFII250 (Burley and Roeder, 1996; Hampsey, 1998) respectivement.

Les HATs sont retrouvées au sein de complexes mutliprotéiques et il est intéressant de noter que certaines sont capables d'interagir entre elles. C'est notamment le cas de PCAF (Yang et al., 1996) et de GCN5 (Xu et al., 1998), capables de lier CBP et p300, et des protéines SRC1 et 3, qui peuvent interagir avec CBP et PCAF (Chen et al., 1997). Ceci suggère que la combinaison de différentes HATs au niveau de promoteurs spécifiques constitue un niveau de contrôle supplémentaire de la transcription.

2) Mécanismes d'activation des HAT

a) **Mécanisme d'activation intrinsèque**

La signalisation de l'AMPC est essentielle pour l'activation de p300 et CBP (Andrisani, 1999). L'action du monoxyde d'azote sur la GAPDH nucléaire active l'autoacétylation de p300 et régule la réponse délétère de p53 via p300/CBP (Sen et al., 2008). La plupart des HAT montrent un mécanisme d'autoactivation impliquant l'autoacétylation. Différentes études ont montré cette autoacétylation des HAT, notamment de TIP60 (Creaven et al., 1999), de PCAF (Santos-Rosa et al., 2003 ; Blanco-Garcia et al., 2009) et de p300 (Thompson et al., 2004). Dans le cas de p300, l'autoacétylation active l'enzyme en révélant le site de fixation au substrat.

Ainsi, l'identification de l'autoacétylation de membres représentatifs de la famille des HAT amène à spéculer que les HAT sont probablement tous régulées par un mécanisme d'activation associé à une autoacétylation similaire à la phosphorylation des kinases.

b) **Les protéines régulatrices**

Les HAT subiraient, comme de nombreuses protéines, un rétrocontrôle négatif. La balance des acétylations cellulaires totales est régulée par l'action des acétyltransférases et des déacétylases. Le maintien de cette balance est critique pour l'homéostasie cellulaire puisque l'acétylation est un régulateur clé de l'expression des gènes. La HAT p300 est déacétylée par la HDAC SIRT2 (Black et al., 2008) qui est dépendante du NAD(+) et qui va réguler l'autoacétylation de p300. PCAF a montré qu'elle pouvait être déacétylée par HDAC3 (Grégoire et al., 2007), qui régule négativement l'activité de Tip60 *in vivo*.

c) **Les modifications régulatrices**

Les modifications post-traductionnelles de la chromatine et des protéines associées à la chromatine sont considérées comme des régulateurs importants de l'expression des gènes. Les modifications sur ces acétyltransférases sont aussi identifiées comme ayant des conséquences fonctionnelles significatives. L'autoacétylation est une des modifications les plus importantes. La phosphorylation des HAT telles que CBP en réponse à l'activation d'une kinase est un autre exemple remarquable du rôle de la modification sur la fonction de l'enzyme (Chawla et al., 1998 ; Hardingham et al., 1999). CBP a montré qu'elle subissait une méthylation sur l'arginine par le *coactivator-associated arginine methyltransferase 1* (CARM1) et en fonction de la région phosphorylée, la fonction de CBP est régulée

différentiellement (Chevillard-Briet et al., 2002 ; Daujat et al., 2002). A noter que les HAT comme p300 (Grossman et al., 2003) et PCAF (Linares et al., 2007) ont montré une activité d'ubiquitination, mais le rôle de l'ubiquitination sur l'activité de l'enzyme n'est pas encore connu.

Des petites molécules sont également modulatrices des HAT, mais leurs fonctions seront développées dans la partie « Stratégie thérapeutique ».

Comme nous l'avons vu, les HAT sont des enzymes clés permettant l'acétylation des histones et entraînant un déroulement de la chromatine et donc une activation transcriptionnelle. Ces modifications des histones ont montré qu'elles participaient à la formation ainsi qu'à la consolidation de la mémoire (Graff and Mansuy, 2009; Levenson and Sweatt, 2006).

Nous nous intéressons principalement à CBP qui est une HAT qui a également une fonction de co-activateur de la transcription car cette enzyme semble particulièrement impliquée dans les désordres neurologiques (Anne-Laurence et al., 2007). Ainsi, CBP pourrait jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer.

3) Description de la CREB binding protein (CBP)

Le gène *cbp* est exprimé de façon ubiquitaire. CBP a d'abord été isolé comme protéine nucléaire qui lie le cAMP response element binding protein (CREB) sous sa forme phosphorylée (Goldman et al., 1997; Kwok et al., 1994). CBP, ainsi que p300 avec lequel CBP partage de nombreuses homologues, est une grosse protéine d'environ 300kDa et de plus de 2400 résidus et qui présente de nombreux domaines d'interactions avec différents facteurs (figure 8). La région centrale contient un motif bromodomaine (Haynes et al., 1992; Jeanmougin et al., 1997) qui est retrouvé dans d'autres HAT comme Gcn5, PCAF et TAF_{II}250. Le bromodomaine permet à la protéine de se lier aux lysines acétylées.

CBP présente deux fonctions principales : une fonction HAT et une fonction co-activatrice de la transcription, qui interviennent toutes les deux dans l'activation de la transcription. CBP ne se lie pas directement à l'ADN, mais est recrutée au niveau de promoteurs particuliers grâce à des interactions avec des facteurs de transcription qui se lient à l'ADN. CBP est capable de se lier à de nombreux facteurs de transcription cellulaires tels que E1A et CREB phosphorylée ainsi que de nombreuses hormones nucléaires, CBP présente un domaine KIX qui lie CREB, Jun ou encore un domaine de liaison à p53, FOS, PCAF

(figure 8). Une fois fixé sur le facteur de transcription qui l'a recruté, lui-même fixé sur son élément de réponse, CBP est capable d'acétyler les lysines des extrémités N-terminales des 4 histones présentes dans le nucléosome. Ces acétylations vont permettre de faciliter la transcription du gène, en amont duquel CBP est fixée. A noter que cette fonction HAT permet également d'acétyler des protéines non histones (Sterner and Berger, 2000).

A noter que le domaine KIX ainsi que le domaine à activité HAT et le domaine SID (steroid receptor coactivator-1 interaction domain) sont des régions très conservées. En outre, les parties N- et C-terminales constituent des domaines d'activation qui permettent la liaison de CBP à d'autres protéines de la machinerie transcriptionnelle telles que les protéines capables de lier la TATA box (TBP : TATA Binding Protein), TFIIB (Kwok et al., 1994) et la RNA polymérase II (Neish et al., 1998). L'ensemble des interactions que peut réaliser CBP avec les facteurs de transcription et les éléments de la machinerie transcriptionnelle permet une stabilisation du complexe de transcription.

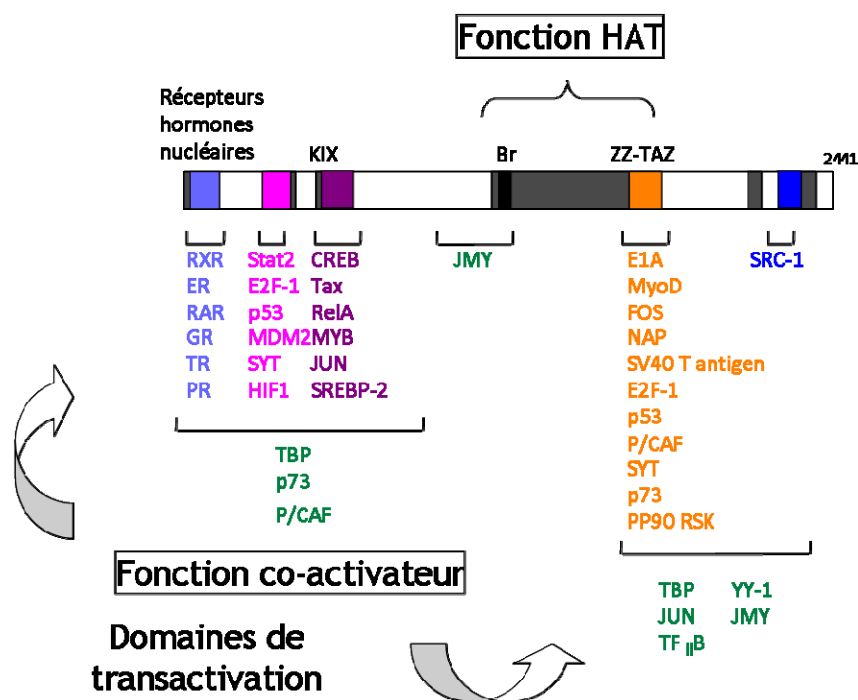


Figure 8 : Domaines et régions d'interactions de CBP.

Sur le diagramme du polypeptide est représenté plusieurs domaines et séquences, incluant un domaine de liaison aux hormones nucléaires, le domaine KIX permettant notamment la liaison à CREB, un bromodomaine (Br), un domaine HAT, les doigts de zinc putatifs ZZ et TAZ. En dessous du diagramme est indiquée les protéines qui ont montré qu'elles interagissaient avec certaines régions de CBP. P/CAF a montré qu'elle interagissait avec 2 régions de CBP. CBP présente 2 grandes fonctions : une fonction de co-activateur et une fonction HAT.

Au sein du domaine HAT, deux régions nécessaires à l'activité enzymatique de CBP ont été identifiées. La première (AA 1459 à 1541) est partiellement conservée entre les HATs et serait le siège de la liaison au coenzyme A (Marmorstein and Roth, 2001; Martinez-Balbas et al., 1998). La seconde, propre à CBP est un domaine en doigt de zinc de type PHD (Aasland et al., 1995; Kalkhoven et al., 2002) nécessaire à l'activité enzymatique (Bordoli et al., 2001).

L'activité transcriptionnelle de CBP est augmentée en présence de protéine kinase A (PKA) (Chrivia et al., 1993 ; Xu et al., 1998). D'autres régulations de ce type ont fait l'objet d'études similaires. La phosphorylation de CBP par les MAPK (Mitogene-Associated Protein Kinases) a été associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur Elk-1 (Janknecht and Nordheim, 1996). De même, il a été montré dans la lignée cellulaire PC12 que le NGF permettait l'activation de CBP par l'intermédiaire des MAPK (Liu et al., 1998), et que CBP interagissait directement avec la p42 MAPK (Liu et al., 1999). Parallèlement, Ait-Si-Ali et collaborateurs ont apporté la preuve que CBP était effectivement un substrat de la p42/p44 MAPK *in vitro*, et que cette phosphorylation permet d'augmenter l'activité HAT de CBP en induisant des changements conformationnels intramoléculaires (Ait-Si-Ali et al., 1999). Des résultats similaires ont été obtenus avec la cycline dépendent kinase 2 (cdk2) (Ait-Si-Ali et al., 1998). CBP a également été ajouté à la liste des substrats de la PI-3-kinase et de la calcium-calmoduline kinase-IV (CamKIV). La phosphorylation de CBP au niveau de la sérine 436 par la PI-3-kinase a pour conséquence d'augmenter l'interaction de CBP avec le facteur de transcription Pit-1 *in vitro* (Zanger et al., 2001). L'activation de la CamKIV par la signalisation induite par le NMDA induit la phosphorylation de CBP sur la sérine 301, permettant l'augmentation de son activité transcriptionnelle mais pas de son activité HAT (Impey et al., 2002).

Un exemple de régulation de l'activité de CBP est sa méthylation, sur deux résidus Arginines distincts, par l'enzyme CRAM1 (Coactivator Associated Methyltransferase-1) (Chevillard-Briet et al., 2002; Xu et al., 2001). La méthylation de CBP, au niveau du domaine KIX, bloque le recrutement de CBP par CREB phosphorylé, en faveur du recrutement de CBP dans la signalisation des hormones nucléaires (Xu et al., 2001). Ceci suggère que les modifications post-traductionnelles dont CBP peut être l'objet permettraient non seulement de moduler les activités HAT et transcriptionnelles de CBP, mais également son recrutement spécifique dans une voie de signalisation donnée.

Enfin, toute modification de l'interaction des protéines entre elles au sein du complexe transcriptionnel est susceptible de moduler l'activité de CBP. Ainsi, les interactions avec les

protéines C/EBP (CAAT/Enhancer Binding Protein), NF-E2 (Nuclear Factor-Erythroid derived 2) ou HNF-1 (Hepatocyte Nuclear Factor-1) accroissent l'activité HAT de CBP (Chen et al., 2001; Soutoglou et al., 2001), alors que la liaison au facteur de transcription PU.1 est au contraire inhibitrice (Hong et al., 2002).

CBP est indispensable pour l'embryogénèse, en effet, la mutation homozygote (par délétion) de *cbp* induit une létalité embryonnaire chez les souris mutées (Oike et al., 1999) et les souris hétérozygotes (*cbp*^{+/-}) présentent des défauts de croissance liés à la fermeture du tube neural, ainsi que des malformations cranio-faciales (Oike et al., 1999; Tanaka et al., 1997). Ce phénotype particulier est retrouvé chez l'Homme dans le syndrome de Rubinstein-Taybi (Rubinstein and Taybi, 1963), une maladie congénitale résultant de la mutation hétérozygote de *cbp* entraînant une haplo-insuffisance et caractérisée entre autres par des désordres neurologiques (Petrij et al., 1995). Il apparaît donc que CBP joue un rôle important au cours du développement embryonnaire, notamment dans le système nerveux central et le développement du squelette. De même, des mutations sur ce gène ont entraîné des cancers humains tels que la leucémie myéloïde (Goldman et al., 1997).

4) Implication de la CREB binding protein (CBP) dans les mécanismes de mémorisation

Les études concernant CBP ont montré l'implication de l'activité HAT de CBP dans la formation de la mémoire à long terme chez les rongeurs (Barrett and Wood, 2008; Hallam and Bourtchouladze, 2006).

Différentes souris transgéniques portant sur le gène de *cbp* ont été développées afin d'étudier l'action de *cbp* sur la mémorisation. Les premiers travaux chez les souris *cbp*^{+/-} ont montré que la potentialisation à long terme était affectée chez ces souris (Oike et al., 1999).

D'autres études ont été réalisées dans des modèles transgéniques murins portant des mutations du gène de *cbp* et entraînant une dysfonction de l'activité de CBP (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004; Wood et al., 2005). Ces souris transgéniques avec une mutation de CBP ont subi une batterie de tests d'apprentissage et de mémorisation. Comme nous l'avons vu, les souris pour lesquelles il manquait un allèle de CBP (souris CBP^{+/-}) ont été proposées pour modéliser le syndrome de Rubinstein-Taybi. Ces souris ont montré un déficit sévère de la phase tardive de la potentialisation à long terme de l'hippocampe et des troubles de la mémoire à long terme (Alarcon et al., 2004; Bourtchouladze et al., 2003). Chez les souris

exprimant conditionnellement une déficience pour la fonction HAT de CBP, il a été démontré que l'activité enzymatique HAT de CBP était nécessaire pour le stockage de la mémoire (Korzus et al., 2004). Les souris exprimant un CBP tronqué dominant négatif, ont montré que l'extrémité amino-terminale de CBP était impliquée dans la liaison à des facteurs de transcription (tels que CREB) et jouait un rôle important dans la plasticité synaptique et la mémoire à long terme (Bourtchouladze et al., 2003; Oike et al., 1999; Wood et al., 2005). De même, le site de fixation KIX de CBP (permettant notamment la fixation à CREB) est également nécessaire (Stefanko et al., 2009; Vecsey et al., 2007; Wood et al., 2006) dans ces processus de mémorisation. Toutes ces études ont ainsi permis de montrer que CBP et notamment sa fonction HAT participait à la formation de la mémoire à long terme. Très récemment des laboratoires ont pu développer et étudier des souris transgénique CBP knock-out conditionnelles (CBP cKO). Une étude a pu mettre en évidence chez ces souris CBP cKO dans les neurones principaux du cerveau basal antérieur, une atteinte mitigée de la mémoire à long terme, en effet, les souris présentaient une perturbation de la mémoire à long terme notamment en reconnaissance d'objet, mais pas en piscine de Morris, ni en conditionnement à la peur dépendant du contexte (Valor et al., 2011). Ainsi, ces différentes études qui ont examiné l'effet d'une perte partielle ou totale des fonctions de CBP montrent l'implication plus ou moins importante de CBP dans la mémoire à long terme et suggèrent que CBP n'est pas requis pour la formation de la mémoire à court terme (Oike et al., 1999 ; Bourtchouladze et al., 2003 ; Alarcon et al., 2004 ; Korzus et al., 2004 ; Wood et al., 2005 ; Valor et al., 2011). Cependant, une autre étude a considéré des souris KO conditionnelles pour le gène de CBP (CBP cKO) dans le cortex cérébral et a déterminé que ces souris présentaient non seulement une atteinte de la mémoire à long terme mais également de la mémoire à court terme (Chen et al., 2010). Cette perte de la mémoire à court terme peut s'expliquer par la baisse de la transcription basale de gènes impliqués dans les processus de mémorisation et l'absence des protéines correspondantes, au moment de la sollicitation de la mémoire à court terme, empêche le bon fonctionnement de cette mémoire. On peut noter que les résultats comportementaux observés sont différents entre les 2 études sur les souris CBP cKO (Chen et al., 2010 ; Valor et al., 2011). Cette différence pourrait s'expliquer par l'importance de la zone de cKO, en effet dans la publication de Chen, tout le cortex cérébral présente des neurones CBP KO, alors que dans la publication de Valor, seuls les neurones principaux du cerveau antérieur sont touchés par la mutation conditionnelle. Ainsi, ces résultats montrent que l'atteinte d'un ensemble de neurones du cerveau antérieur n'est pas suffisante pour

entraîner des troubles importants de la mémoire à long terme, pour cela, il faut que cette atteinte soit drastique et qu'elle implique de nombreuses aires cérébrales.

A noter que d'autres protéines présentant une fonction HAT, telles que p300 (Oliveira et al., 2006 et 2007) qui a de nombreuses homologies avec CBP, et p300/CBP-associated factor (PCAF) ont récemment été impliquées dans des processus de mémorisation (Maurice et al., 2008). Les souris transgéniques conditionnelles exprimant une forme tronquée inhibitrice de p300, à laquelle il manque la partie carboxy terminale contenant la fonction HAT et des domaines d'activation, montrent des déficits de mémoire à long terme liée à la reconnaissance d'objet ou liée à un conditionnement à la peur dépendant du contexte (Oliveira et al., 2007). A noter qu'aucun déficit de mémoire à court terme n'est décrit, ni avec un conditionnement dépendant d'un son, ni en mémoire spatiale en piscine de Morris (Oliveira et al., 2007). Les souris PCAF KO révèlent des troubles de la mémoire à court terme à 2 mois d'âge, mais sans déficit de la mémoire à long terme (Maurice et al., 2008). Ces altérations sont associées à une forte réponse au stress (par exemple augmentation de la corticostéronémie), et elles évoluent avec l'âge. En effet, à 6 mois les souris PCAF KO commencent à montrer des déficits de mémoire à long terme, notamment en piscine de Morris et ces déficits sont accentués à 12 mois (Maurice et al., 2008).

Ainsi CBP n'est pas la seule HAT à intervenir dans les processus de mémorisation et on peut imaginer que ces HAT, qui ont démontré leur implication dans ces processus (CBP, p300, PCAF), sont coordonnées pour orchestrer les différents types de mémoire.

5) Implication de CBP dans les maladies neurodégénératives

Des résultats obtenus au laboratoire ont montré que CBP était une cible de la signalisation apoptotique de la protéine précurseur amyloïde (APP) dans les neurones corticaux (Rouaux et al., 2003). Il faut noter, que l'activité de la caspase 6, dont CBP est un des substrats (Rouaux et al., 2003), a été mise en évidence dans les dégénérescences neurofibrillaires de cerveaux de patients atteints de MA (Albrecht et al., 2007; Guo et al., 2004; Guo et al., 2006) et ceci soulève l'hypothèse intéressante d'une dégradation de CBP dans la MA.

De plus, on peut noter qu'une publication a fait également un lien intéressant entre la MA et la perte de CBP, pouvant expliquer, du moins en partie, les troubles de la mémoire retrouvés dans la pathologie. En effet, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, des

souris dans lesquelles les gènes encodant les présénilines PS1 et PS2 ont été invalidés spécifiquement dans le cortex, et les auteurs ont montré chez ces souris une altération de la mémoire à long terme liée à une diminution de la LTP (Saura et al., 2004). En outre, ces mutants conditionnels PS1-/-/PS2-/- présentaient une diminution des taux de protéine CBP dans le cytoplasme et le noyau des cellules corticales, ainsi qu'une diminution des taux d'ARNm codant CBP alors que les taux de protéines CREB et CREB phosphorylé étaient inchangés. En conséquence, les gènes régulés par le complexe CREB/CBP étaient également partiellement réprimés. Ceci suggère une régulation positive de l'expression de *cbp* par les présénilines et un rôle de CBP dans la plasticité neuronale et la mémoire à long terme (Saura et al., 2004).

Comme dans les mécanismes de mémorisation où la fonction HAT de CBP est indispensable pour la consolidation de la mémorisation, celle-ci semble être également indispensable aux processus neuroprotecteurs. En effet, l'addition de CBP ou de p300 dans des neurones en culture en conditions apoptotiques protège les neurones, mais l'ajout de CBP mutée, avec une délétion du domaine HAT (CBP Δ HAT), n'empêche pas la mort neuronale (Rouaux et al., 2003). Une étude récente *in vivo* a même permis de montrer que l'administration de particules virales contenant CBP dans l'hippocampe de souris triple transgéniques MA, restaurait les déficits d'apprentissage et de mémorisation de ces souris (Caccamo et al., 2010). Ainsi, la préservation des niveaux de CBP semble être très importantes dans des pathologies telles que la MA et l'augmentation de l'activité de CBP apparaît être une voie thérapeutique intéressante dans cette maladie.

La MA n'est pas la seule maladie neurodégénérative pour laquelle CBP semble impliquée. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence l'altération de la fonction de CBP dans différents contextes neurodégénératifs, comme par exemple dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Rouaux, et al., 2003; Rouaux, et al 2007), dans des maladies à poly-glutamines (poly-Q) dont la maladie de Huntington (Steffan et al., 2001), mais également dans l'atrophie musculaire spinale, dans l'atrophie musculaire spino-bulbaire et d'autres maladies du motoneurones (Echaniz-Laguna et al., 2008). En effet, l'hypoacétylation résultant de la perte de fonction de CBP entraîne également l'altération de la transcription de gènes neuroprotecteurs, tels que le BDNF (Langley, et al., 2005 ; Rouaux, et al., 2004; Saha and Pahan 2006).

Il est intéressant de noter que la perte de fonction de CBP, observée dans ces divers contextes pathologiques, est associée à des mécanismes variés : des mutations génétiques, des répressions transcriptionnelles, des séquestrations protéiques ou des clivages protéolytiques.

La diversité des pathologies et des mécanismes associés à la perte de la protéine CBP fonctionnelle souligne le rôle clé de ce coactivateur transcriptionnel dans le bon fonctionnement neuronal. En somme, la perte de fonction de CBP apparaît importante dans différents contextes neuropathologiques, suggérant que CBP est une protéine potentiellement neuroprotectrice.

Concernant, les autres HAT, une étude a pu montrer une action intéressante de PCAF dans un modèle non transgénique de MA. Dans cette étude, des souris PCAF KO ont subi des injections de peptides A β qui n'ont pas induit de toxicité, en effet les peptides n'ont pas aggravé les déficits mnésiques de ces souris, contrairement aux souris *wild-type* (Duclot et al., 2010). Cette étude suggère que PCAF régule l'expression des protéines impliquées dans la production et la dégradation des peptides A β .

Ainsi, la modulation de l'activité acétyltransférase apparaît être une voie intéressante pour développer des thérapies dans la MA.

D. Histones déacétylases (HDAC)

Les histones déacétylases (HDAC) vont permettre d'enlever un groupe acétyl présent au niveau des lysines des acides aminés des histones et restaurent ainsi la charge positive des résidus lysines (Thiagalingam et al., 2003 ; Acharya et al., 2005).

Les HDAC ont été impliquées dans la répression transcriptionnelle (Knoepfler and Eisenman, 1999), la progression du cycle cellulaire (Marzio et al., 2000), la différenciation (Marks et al., 2000), la réplication de l'ADN (Iizuka and Stillman, 1999), ainsi que dans la réponse suite à un dommage à l'ADN (Sakaguchi et al., 1998).

Les séquences protéiques (en dehors de celles du domaine catalytique) sont très différentes, indiquant que ces enzymes ont différentes fonctions biologiques et un large répertoire de substrats autre que les histones. De fait, de nombreuses protéines non histones sont les cibles des HDAC : les facteurs de transcription, les enzymes réparant l'ADN, les protéines chaperonnes, les protéines de structure, les médiateurs de l'inflammation, les protéines virales entre autres (Xu et al., 2007).

Les HDAC ont été hautement conservées durant l'évolution entre les différentes espèces. Chez l'homme, 18 protéines HDAC ont été identifiées et catégorisées en quatre classes basées sur l'homologie des HDAC des levures (de Ruijter et al., 2003). Ces enzymes peuvent également être identifiées et classifiées selon la dépendance à un co-facteur et selon

une similarité de séquence. Dans ce cas, deux familles de HDAC sont distinguées : les HDAC classiques qui requièrent le Zn^{2+} pour l'activité déacétylase et les HDAC liés à sir2 (Silent Information Regulator 2) qui requièrent NAD^+ comme cofacteur.

- Classe I : comprend les HDAC 1, 2, 3 et 8 (de Ruijter et al., 2003) qui sont homologues au régulateur de transcription Rpd3 (Reduced Potassium Dependency) de la levure (Taunton et al., 1996; Yang et al., 1996). Cette classe de HDAC est ubiquitaire et localisée dans le noyau. Seule HDAC 3, possède en plus d'un signal de localisation nucléaire (NLS) un signal d'export nucléaire (NES) suggérant qu'elle pourrait être présente dans le cytoplasme. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a mis en évidence la présence de HDAC 3 dans le cytoplasme, ce qui pourrait s'expliquer par son recrutement par les HDAC 4, 5 et 7 lorsque celles-ci sont liées à l'ADN au sein de complexes de répression (Fischle et al., 2002). HDAC 1 et 2 ne présentent d'activité enzymatique qu'au sein de complexes tels que Sin3, NuRD (nucleosome remodelling and deacetylating) et Co-REST, qui outre ces deux HDACs comprennent également les protéines RbAp48 et RbAp46 (Rb associated proteins 48 et 46) (Nicolas et al., 2000; Zhang et al., 1999). HDAC 1 et 2 peuvent également lier directement des protéines de liaison à l'ADN telles que YY1 (Yin and Yang 1) (Yao et al., 2001), ou la protéine du rétinoblastome Rb (Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). Les HDACs 1 et 2 présentent en outre la particularité de voir leur activité et leur recrutement au sein des complexes de répression modulés par phosphorylation (Galasinski et al., 2002; Pflum et al., 2001). HDAC-2 semble plus impliquée dans les processus de mémorisation que la HDAC1 (Guan et al., 2009). De même HDAC-3 apparait jouer un rôle dans la mémorisation à long terme (McQuown et al., 2011). HDAC-3 est retrouvée au sein des complexes SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors) et N-CoR (Nuclear receptor Co-Repressor) et permet également l'interaction Rb-RbAp48 de même que la répression induite par l'association Rb-E2F (Pantelieva et al., 2004). HDAC 8 est encore relativement peu décrite, et semble très peu exprimée (Buggy et al., 2000; Hu et al., 2000).

Les quatre membres de cette classe de HDAC ont montré qu'ils étaient sensibles aux inhibiteurs spécifiques de HDAC (HDACi) tel que la trichostatine A ou l'acide valproïque. Il faut noter qu'en plus de cette inhibition spécifique, l'acide valproïque

induit une dégradation protéosomique de HDAC2 contrairement aux autres inhibiteurs tel que la TSA (Kramer et al., 2003).

- Classe II : inclut les HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10 qui sont homologues du Hda1 de la levure (Grozinger et al., 1999; Guardiola and Yao, 2002; Zhou et al., 2001). Comme les enzymes de classe I, les membres des HDAC de classe II ont montré une grande variété de complexes protéiques (Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999). Cependant, l'expression de ces enzymes est plus restreinte que celle des membres de la classe I, suggérant des rôles plus spécifiques dans les phénomènes de différenciation et de développement (Buggy et al., 2000; Galasinski et al., 2002). Par ailleurs, ces protéines peuvent avoir dans certains cas une localisation cytoplasmique et non strictement nucléaire. Les HDAC de classe II ont une expression tissu spécifique et sont essentiellement exprimées dans le muscle strié et le cerveau (Johnstone, 2002; Marks et al., 2001; Vigushin and Coombes, 2002). Les HDAC de classe II ont un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaires (Lehrmann et al., 2002).

Cette classe peut être subdivisée en deux sous classes selon leur similitude structurale : la classe IIa (HDAC 4, 5, 7 et 9) et la classe IIb (HDAC6 et 10). Il a été décrit que les HDAC 4, 5 et 7 s'associent à certains facteurs de transcription, jouant ainsi un rôle critique notamment dans la survie neuronale (Chawla et al., 2003 ; Bolger and Yao 2005). Ces protéines sont capables de réprimer l'activité du facteur de transcription MEF-2, bloquant ainsi la différenciation musculaire. Ce blocage peut être levé par la phosphorylation des HDACs par l'activité CamK (McKinsey et al., 2000). La localisation dans la cellule de ces trois HDACs diffère au cours de la différenciation musculaire, suggérant un mécanisme particulier de régulation de l'expression des gènes durant ce processus (Kao et al., 2001; Wu et al., 2001). HDAC 9 est l'HDAC prédominante de la famille de classe II, elle est exprimée dans le muscle et joue notamment un rôle important dans la différenciation musculaire (Zhang et al., 2002). Il existe trois variants connus de cette HDAC (HDAC9a, HDAC9b, HDAC9c/HDRP). Certains types cellulaires peuvent exprimer qu'une seule isoforme alors que d'autres types cellulaires vont exprimer les autres isoformes.

Les différentes HDAC ont des localisations et des fonctions variées. En effet HDAC 6 est localisée exclusivement dans le cytoplasme et est impliquée dans la stabilité des microtubules en ajustant les niveaux d'acétylation de l'alpha tubuline (Hubbert et al.,

2002), suggérant un rôle critique dans les fonctions neuronales. HDAC 10 est capable de s'associer avec plusieurs autres HDAC (HDAC 1, 2, 3, 4, 5 et 7) indiquant qu'il pourrait avoir une fonction de recruteur plutôt qu'une fonction déacétylase (Guardiola and Yao 2002 ; Tong et al., 2002). De plus, HDAC 10 présente deux domaines de liaison potentielle à Rb, suggérant un rôle de cette enzyme dans la régulation du cycle cellulaire (de Ruijter et al., 2003)

Comme les HDAC de classes I, les HDAC de classes II sont inhibés par la trichostatine A (TSA).

- Classe III : ces HDAC ont des domaines catalytiques similaires aux déacétylases Sir2 (Silent Information Regulator 2) NAD⁺-dépendant des levures (Buck et al., 2004). Cette classe est insensible à la TSA (Yoshida et al., 1990). Les HDAC de cette classe ne semblent pas avoir les histones comme substrat primaire, et sont impliquées dans la déacétylation d'autres protéines. Elles ne sont donc pas considérées comme des HDAC classiques (Guarente, 2000). Les HDAC de classe III ont également une fonction d'ADP ribosylation (Kruszewski and Szumiel, 2005). Il a été montré que SIRT1 (sirtuine), l'homologue de Sir2 chez les mammifères, a un rôle très important dans la survie neuronale : en déacétylant le facteur de transcription FOXO, elle permet le maintien d'une signalisation neuroprotectrice. En outre, l'activation pharmacologique de SIRT1 s'avère une approche thérapeutique intéressante dans le traitement de la chorée de Huntington (Parker et al., 2005). SIRT1 est également capable d'interagir avec p53 et MyoD, participant ainsi à la tolérance au stress, à la différenciation et au développement (Hisahara et al., 2005), et de déacétyler p53 et l' α -tubuline, au même titre que FOXO, contre balançant les activités HATs sur ces protéines (Marmorstein, 2004).
- Classe IV : elle correspond à la HDAC11 qui est l'isoforme la plus récemment identifiée. Du point de vue structural, elle se tient à la frontière entre les classes I et II. Sa localisation est uniquement nucléaire, et son expression est restreinte à certains tissus (rein, cœur, cerveau, muscle squelettique et testicule). HDAC11 a une activité HDAC qui peut être inhibée par la trapoxin (Gao et al., 2002).

E. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mémorisation

1) La plasticité

Le tissu nerveux se compose de neurones et de cellules gliales étroitement enchevêtrées formant un système complexe de connexions cellulaires. Ce système a pour fonction de transmettre et de coordonner des informations. Les cellules nerveuses établissent ainsi de véritables circuits grâce auxquels les informations sont perçues, transmises et intégrées sous la forme de signaux électriques et chimiques. Les cellules gliales, pour leur part, ont essentiellement un rôle de soutien et de protection.

Depuis la formation du système nerveux chez le fœtus jusqu'au développement du cerveau « adulte », le système nerveux va évoluer et subir de profonds changements qui vont permettre la mise en place des différentes régions cérébrales et leurs connexions. C'est ce que l'on appelle la plasticité développementale ou morphogénèse. Elle est caractérisée par une prolifération, une migration et une différenciation cellulaire durant les premiers mois de la vie postnatale (Chan et al., 2002). Les cellules nerveuses et les cellules gliales acquièrent ainsi leur forme caractéristique hautement polarisée ; elles émettent des prolongements qui se développent à partir de leur corps cellulaire et sont munies à leur extrémité d'une structure très spécialisée : le cône de croissance. Il est impliqué dans l'orientation, le déplacement et la croissance du prolongement. Pour les neurones, lorsque le cône de croissance atteint sa cible, il y a synaptogénèse : ceci correspond au stade du développement pendant lequel les neurones établissent des contacts fonctionnels ou synapses (Vaughn, 1989). Cette plasticité est ensuite caractérisée par une maturation et une sélection neuronale importante impliquant, entre autre, une perte synaptique et cellulaire. En effet, environ 40% des synapses sont sélectivement éliminées (Huttenlocher, 1979). La maturation et l'élagage des épines dendritiques sont dépendants de l'expérience sensorielle et sont impliqués dans l'affinement des connexions synaptiques (Churchill et al., 2002). A la fin de leur maturation, les neurones sont caractérisés par un corps cellulaire appelé le soma, un prolongement fin, unique, éventuellement ramifié : l'axone ; et des excroissances autour du soma qui peuvent être très longues, très ramifiées et touffues : les dendrites. Cette asymétrie correspond schématiquement à une séparation des fonctions du neurone. Les dendrites reçoivent les informations, le soma les intègre et l'axone les transmet.

Une fois le développement du cerveau terminé, celui-ci n'est pas immuable, il va pouvoir se modifier et évoluer. Autant la plasticité développementale va dépendre

essentiellement du programme génétique permettant le développement normal de l'individu, mais va dépendre également des stimuli extérieurs (ex : alcool pendant la grossesse va entraîner des troubles du développement et notamment des dommages du système nerveux central), autant par la suite, les modifications du cerveau vont dépendre fondamentalement de l'interaction de l'individu avec son environnement. Ainsi, l'apprentissage et la mémorisation vont être à l'origine de ce que l'on appelle la plasticité synaptique qui permettra la mémoire de la trace. Dès 1894, Ramon y Cajal (1852-1934 Prix Nobel 1906) proposa l'association de la mémoire aux connexions entre les neurones, autrement dit aux synapses, plutôt qu'à la création de nouveaux neurones. Ceci a été le premier concept de plasticité synaptique. Cette plasticité peut être définie comme la capacité des neurones à moduler la force de leur connexion synaptique en fonction de leur activité neuronale. Cette modulation de la connexion va correspondre à des modifications morphologiques, chimiques et fonctionnelles qui interviennent au cours du temps au niveau de la synapse (revue Hofer and Bonhoeffer, 2010). La compréhension des règles qui régissent l'association et la mise en réseaux de neurones remontent aux travaux fondateurs de Donald Hebb il y a plus d'un demi-siècle (Hebb, 1949). Selon Hebb, si deux neurones reliés par une synapse sont à un instant donné simultanément actifs, cette synapse voit son efficacité de transmission accrue. Ce postulat inspira plusieurs chercheurs et un premier mécanisme le supportant, la potentialisation à long terme (*long term potentiation LTP*) fut découverte par le norvégien Lomo qui observa dans l'hippocampe de lapin ce phénomène initialement dénommé *long lasting potentiation* (Anderson and Lomo, 1966 ; Andersen et al., 1966).

Comme nous le verrons par la suite, la potentialisation à long terme (LTP) va permettre la mise en place de programmes transcriptionnels qui vont permettre par exemple le remaniement des synapses ou encore la formation d'épines dendritiques impliqués dans la mémorisation à long terme. La LTP va faire intervenir les récepteurs au glutamate (Harris et al., 1984 ; Morris et al., 1986).

2) Les récepteurs glutamatergiques

Le glutamate, forme ionisée de l'acide glutamique, est le principal neuromédiateur excitateur du système nerveux central. Ce neuromédiateur agit sur des récepteurs canaux et sur des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les récepteurs canaux du glutamate (NMDA, AMPA, kaïnate ou KAR), à perméabilité cationique, ou récepteur ionotrope, interviennent dans le développement des synapses et les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage. Leur stimulation excessive via les récepteurs AMPA entraîne la mort neuronale (Buchan et al., 1991 ; Nellgard and Wieloch, 1992 ; Sheardown et al., 1993).

Les RCPG du glutamate (mglu 1 à mglu 8) ou récepteur métabotropes, ont un rôle modulateur du fonctionnement neuronal (Reymann et al., 1989 ; Izumi et al., 1991 ; McGuinness et al., 1991).

Les neurones glutamatergiques sont largement distribués dans l'ensemble du système nerveux central. Le glutamate, stocké dans les vésicules de l'extrémité axonale des neurones, est sécrété par exocytose suite à un potentiel d'action axonal et à l'influx de calcium qu'il déclenche.

Le glutamate se lie à ses divers récepteurs post-synaptiques et pré-synaptiques (figure 9). Il n'est pas métabolisé dans la fente synaptique, mais est capté principalement par les cellules gliales voisines grâce aux transporteurs membranaires EAAT1, EAAT2, Glt1 et Glast. La glutamine synthétase de ces cellules métabolise le glutamate en glutamine. La glutamine est exportée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs membranaires (transporteurs SN1 et SN2), pour être captée par les neurones glutamatergiques (transporteurs SA). Ce processus bicellulaire est dénommé cycle glutamate-glutamine (Gibbs et al., 2008).

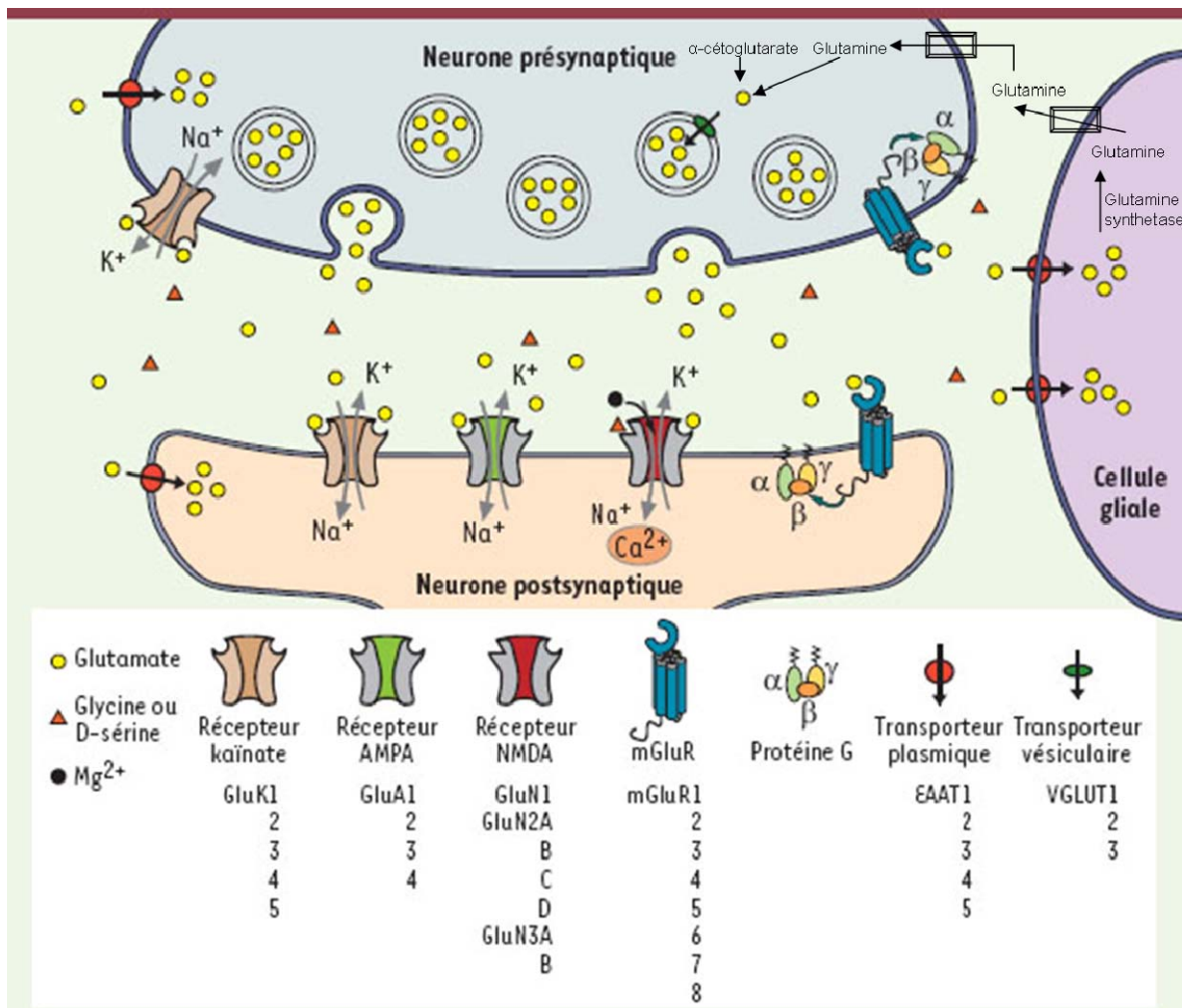


Figure 9 : La synapse glutamatergique (adapté de Gielen, 2010)

a) Les récepteurs ionotropes

Ces récepteurs sont des homo ou des hétérotétramères constitués de protéines à trois hélices transmembranaires. Ils sont perméables aux ions Na^+ , Ca^{2+} , et K^+ , avec une sélectivité variée pour chaque ion (MacDermott et al., 1986 ; Jahr and Stevens, 1987 ; Mayer and Westbrook, 1987). Trois familles de récepteurs-canaux du glutamate ont été distinguées en fonction de leurs affinités respectives pour deux analogues de synthèse du glutamate, le NMDA, N-méthyl-D-aspartate, et l'AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasolepropionate, et pour le kainate. Le nom de ces agonistes qualifie chaque famille de récepteurs ionotropes du glutamate : récepteurs NMDA, récepteurs AMPA et récepteurs kainate ou KAR. Ils ont tous une perméabilité cationique, mais les KAR peuvent être aussi couplés à des protéines G (Cunha et al., 1999 ; Lerma 2003 ; Rodriguez-Moreno and Sihra, 2007).

Structure des récepteurs ionotropes

Les récepteurs NMDA, AMPA et KAR sont constitués de l'association de sous-unités différentes, sous-forme généralement tétramérique (Dingledine et al., 1999). On peut noter qu'il existe de nombreuses sous-unités différentes en fonction des récepteurs : 6 sous-unités pour le NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A), 4 sous-unités pour l'AMPA (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4) et 5 sous-unités pour KAR (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2). La multitude des sous-unités suggère une grande diversité potentielle des récepteurs ionotropes. Cette diversité serait encore augmentée par épissage alternatif de plusieurs sous-unités. Ces récepteurs sont souvent présents sous forme de dimères, voire tétramères (Traynelis et al., 2010). Contrairement aux récepteurs nicotiques, il a été démontré que l'extrémité C-terminale est intracellulaire. Ces sous-unités ne comprendraient que 3 hélices transmembranaires (contre 4 pour les récepteurs nicotiques), le segment suivant la première hélice constituant une boucle intracytoplasmique entrant partiellement dans la membrane, motif commun aux autres canaux ioniques mais dont la boucle entrante est située sur la face externe de la membrane (figure 10).

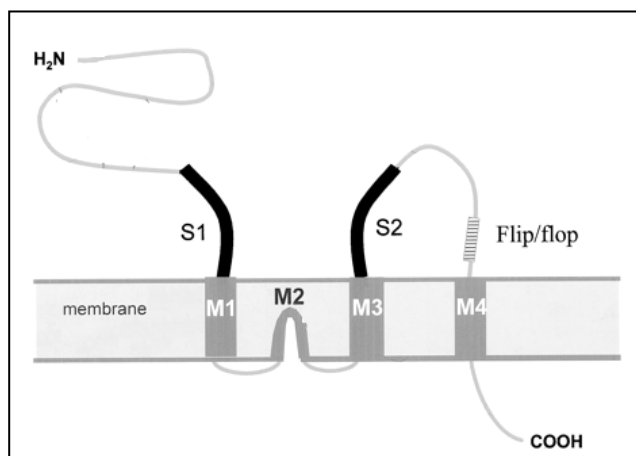


Figure 10 : Structure d'une sous-unité d'un récepteur ionotrope au glutamate
S1 et S2 sont les domaines de liaison aux ligands (adapté de Dingledine et al., 1999)

Localisation et rôle

Les récepteurs NMDA et AMPA sont post-synaptiques, localisés principalement au niveau somato-dendritique de nombreux neurones centraux. Les récepteurs NMDA sont très largement répandus dans tout le système nerveux central et généralement colocalisés avec les récepteurs AMPA. Ils sont particulièrement nombreux dans le cerveau antérieur avec une densité élevée dans la région de CA1 de l'hippocampe.

Leur stimulation induit une dépolarisation membranaire générant des potentiels post-synaptiques excitateurs, correspondant au rôle excitateur du glutamate. La dépolarisation

induite par stimulation d'AMPA est rapide et favorise la stimulation des NMDA qui induit une dépolarisation plus lente (Mayer et al., 1984). L'entrée de calcium est le second phénomène caractéristique de la stimulation des récepteurs NMDA et de certains AMPA. L'augmentation intracellulaire de la concentration en Ca^{2+} entraîne notamment la stimulation de la protéine kinase activée par le couple calcium-calmoduline, CAM-kinase II, impliquée dans le phénomène de potentialisation à long terme (*long term potentiation* LTP). L'entrée excessive de calcium par hyperstimulation des récepteurs NMDA pourrait aussi induire une apoptose neuronale, qui serait impliquée dans la neurodégénérescence observée dans les accidents ischémiques cérébraux, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Tymianski et al., 1993 ; Sattler et al., 1998).

Les récepteurs kaïnate, KAR, sont généralement pré-synaptiques, situés sur des synapses glutamatergiques (homorécepteurs) ou GABAergiques (hétérorécepteurs) (Chittajallu et al., 1996), mais ils ont été localisés également au niveau post-synaptique (Castillo et al., 1997 ; Vignes and Collingridge, 1997). L'hippocampe et les couches infragranuleuses de cortex en sont particulièrement riches. Curieusement, la stimulation des KAR présynaptiques ne met pas en jeu leur fonction ionotrope, mais active des protéines G trimériques G_i et G_q , menant à la diminution de l'exocytose du glutamate ou du GABA (Frerking et al., 2001). Des KAR post-synaptiques peuvent mettre en œuvre leur fonction ionotrope avec un rôle excitateur, ou leur signalisation via des protéines G avec des effets régulateurs variés. Ces propriétés de KAR remettent en question la dichotomie de classification ionotrope/métabotrope des récepteurs du glutamate.

b) Les ligands des récepteurs NMDA

De nombreux ligands, endogènes et de synthèse, se lient à divers sites des sous-unités NR1 ou NR2 des récepteurs NMDA (figure 11), en tant qu'agonistes, co-agonistes ou modulateurs allostériques qui diminuent ou augmentent la probabilité d'ouverture du canal ionique avec des potentialités thérapeutiques variées (revue : Paoletti and Neyton, 2007).

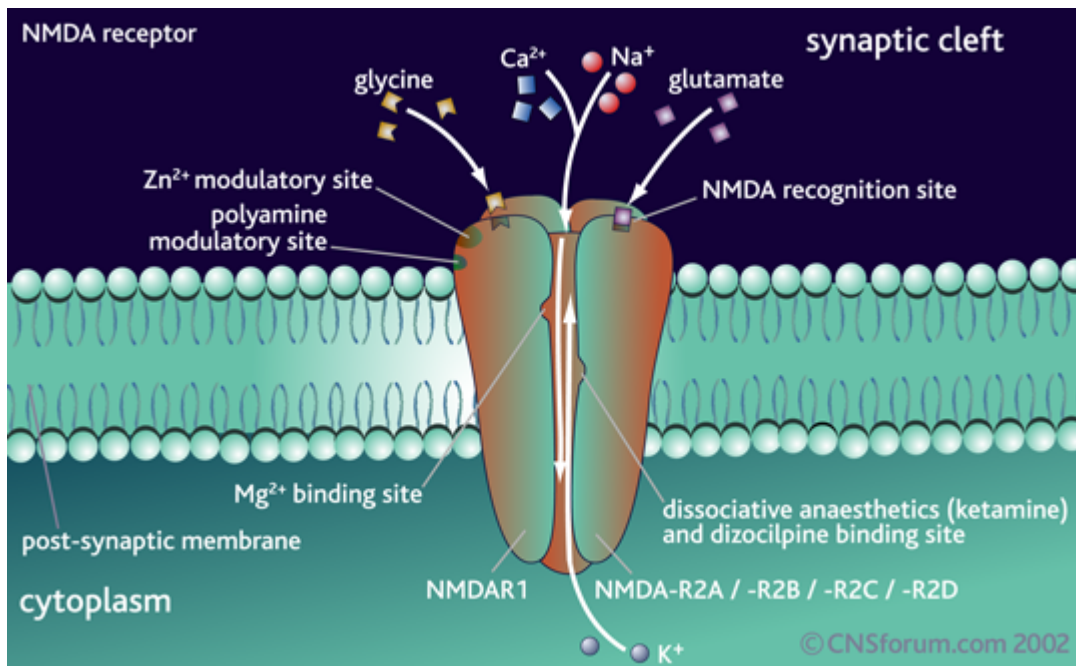


Figure 11 : Sites de liaisons des ligands des récepteurs NMDA (d'après Scatton, 1993)

Agonistes et co-agonistes

Le NMDA est l'agoniste de synthèse de référence, d'intérêt expérimental. Le L-glutamate est l'agoniste physiologique des récepteurs NMDA. Il se lie à l'extrémité N-terminale des sous-unités NR2A et NR2B. Le L-aspartate est considéré comme médiateur potentiel, c'est pourquoi il fait partie avec le glutamate des acides aminés excitateurs, mais son rôle physiologique éventuel est peu défini. Le L-aspartate active le récepteur NMDA mais est inactif sur les récepteurs AMPA et KAR.

La glycine (glycocolle) est considérée comme co-agoniste nécessaire à l'activation du récepteur NMDA (Johnson and Ascher, 1987). Elle se lie à l'extrémité N-terminale des sous-unités NR1. L'activation du récepteur NMDA nécessiterait la liaison de 2 molécules de glutamate et de 2 molécules de glycine. Expérimentalement, la D-sérine et la D-cyclosérine sont également agonistes du site de liaison de la glycine.

Modulateurs allostériques endogènes

Les ions Mg^{2+} exercent un blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA. Au potentiel membranaire de repos, la majorité des récepteurs NMDA sont bloqués par des ions Mg^{2+} fixés sur des sites situés dans le canal ionique (figure 11). La dépolarisation membranaire, induite notamment par l'activation des récepteurs AMPA, permet la levée du blocage exercé par le Mg^{2+} sur les récepteurs NMDA (Paoletti and Neyton, 2007).

Les ions Zn^{2+} et H^+ sont également capables d'exercer une inhibition du récepteur NMDA à des concentrations physiologiques (Mayer and Vyklícky, 1989). Zn^{2+} se lierait aux sous-unités NR2A. L'acidification survenant lors de conditions pathologiques comme l'ischémie cérébrale peut inactiver les récepteurs NMDA et donc limiter les risques d'excitotoxicité (Traynelis and Cull-Candy, 1990). Les récepteurs NMDA n'interviendrait alors dans les phénomènes de cytotoxicité qu'après normalisation du pH alors que la concentration de glutamate dans la synapse reste élevée.

Les polyamines endogènes extracellulaires comme la spermine ou la spermidine modulent l'activité des récepteurs NMDA en agissant au niveau d'un site localisé sur la sous-unité NR2B. Ces polyamines endogènes ont au moins 3 effets sur les récepteurs NMDA : inhibition voltage-dépendante, potentialisation glycine-dépendante et potentialisation glycine et voltage indépendante (Rock and Macdonald, 1992).

Les neurostéroïdes (pregnénolone, déhydroépiandrostérone, progesterone..., Baulieu et al., 2001) modulent directement l'activité des récepteurs NMDA par liaison aux sous-unités NR1, et sont donc susceptibles de favoriser la mort neuronale par apoptose ou au contraire d'exercer un effet neuroprotecteur.

La phosphorylation des récepteurs NMDA par des protéines-kinases, principalement PKA et PKC, potentialise l'ouverture du canal ionique. Ces phosphorylations peuvent être induites par liaison de médiateurs à leurs récepteurs RCPG co-localisés.

c) Récepteurs métabotropes

Les récepteurs au glutamate couplés aux protéines G, mglu aussi dénommés récepteurs métabotropes, appartiennent à la famille 3 des RCPG, le site de liaison de l'agoniste se liant à l'extrémité N-terminale (revue : Pin et al., 2004). Ils se présentent sous la forme d'homodimères reliés par des ponts disulfures. Cette dimérisation apparaît indispensable pour qu'il y ait activation du récepteur lors de la liaison du glutamate. Ils sont localisés sur les neurones du système nerveux central et sur les cellules gliales. En périphérie, les récepteurs mglu sont localisés principalement sur les ostéoblastes, les hépatocytes, les cellules pancréatiques et les cellules immunitaires. Le glutamate pourrait ainsi moduler de nombreuses fonctions.

Les récepteurs du groupe I (mglu1 et 5) sont essentiellement localisés au niveau post-synaptique (somatodendritique) (Bruno et al., 1995a). Ils participent au phénomène de potentialisation à long terme. Les récepteurs mglu1 sont particulièrement abondants dans l'hippocampe et le thalamus, et les récepteurs mglu5 dans le cortex, la partie ventrale du

striatum et des structures de l'hippocampe, de l'amygdale et du thalamus. Ils sont couplés à Gq qui va stimuler les phospholipases C β qui vont produire de l'inositol tri-phosphate (IP3) et du diacyl glycerol (DAG) conduisant à la mobilisation des stocks de Ca²⁺ et à l'activation des PKC. Ces protéines kinases vont stimuler les MAP-kinases qui vont permettre une activation transcriptionnelle.

Les récepteurs du groupe II (mglu2 et 3) et du groupe III (mglu 4, 6, 7 et 8), pré- et post-synaptiques, sont tous couplés négativement à l'adénylate cyclase par une protéine Gi (Bruno et al., 1995b). Ils peuvent aussi être couplés à l'ensemble des voies de signalisation initiées par les sous unités $\beta\gamma$ des protéines G.

Le récepteur mglu6 est présent au niveau post-synaptique (somatodendritique). Son activation produit une dépolarisation lente pouvant être due à une réduction du courant potassique voltage-indépendant et voltage-dépendant, 2 courants contribuant à la conductance membranaire de repos.

3) La potentialisation à long terme (*long term potentiation LTP*)

a) **Electrophysiologie de la LTP**

La LTP a été corrélée avec l'acquisition et la rétention d'apprentissages. Lors d'un apprentissage d'une tâche, la répétition de celle-ci, va provoquer la stimulation d'un réseau neuronal. Avec une stimulation identique, les neurones impliqués vont être de plus en plus sensibles à la stimulation et vont s'activer électriquement avec des stimulations plus faibles qui au départ ne permettaient pas le déclenchement d'un potentiel d'action (figure 12).

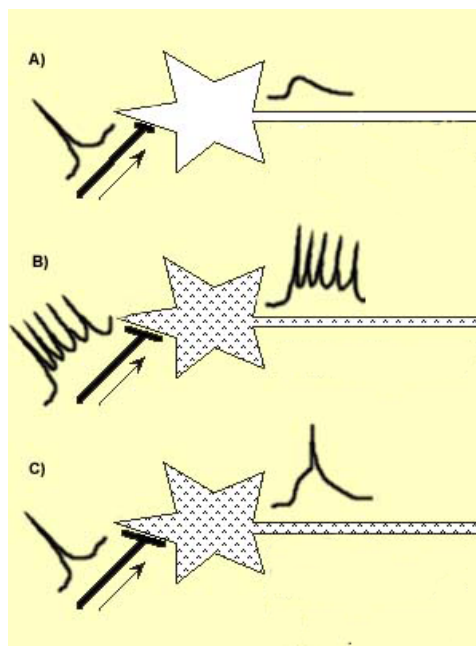


Figure 12 : Schématisation électrophysiologique de la potentialisation à long terme

- (A) Neurone dont la synapse n'est pas assez efficace pour provoquer un potentiel d'action.
- (B) Forte activité simultanée dans les deux neurones
- (C) Neurone dont la synapse renforcée par l'activité simultanée des neurones provoque un potentiel d'action.

(www.lecerveau.mcgill.ca)

Il faut noter qu'à ce jour, la LTP peut être divisée en au moins 2 phases temporelles et moléculaires distinctes, qui peuvent être le reflet de la formation de la mémoire. Une activation électrique correspondant à une série à haute fréquence (par exemple un train de 100 pulsations à 100Hz) peut déclencher une augmentation de l'efficacité synaptique pendant 1 à 2 heures. Cette forme courte de LTP est appelée phase précoce de LTP (*early phase long term potentiation E-LTP*). Celle-ci requiert la modification de protéines existantes et leur transport au niveau des synapses, elle est sous le contrôle de seconds messagers et de kinases, mais elle ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* (Bliss and Collingridge, 1993 ; Malenka and Bear, 2004). On peut rapprocher cette E-LTP de la mémoire à court terme qui dure de quelques minutes à quelques heures et qui ne nécessite pas de synthèse protéique ou d'ARN. Par contre, la répétition de stimulations hautes fréquences (par exemple de nombreux trains de 100 pulsations à 100Hz) va induire une augmentation de l'efficacité synaptique qui peut se prolonger au-delà de 8 heures (Frey et al., 1988) ou même plusieurs jours (Abraham, 2003). Cette LTP appelé LTP tardive (*late LTP L-LTP*) diffère de la E-LTP dans la nécessité d'une nouvelle synthèse protéique et dans l'association avec des changements structuraux des synapses (Frey et al., 1988 ; Harris et al., 2003 ; Kandel, 2001 ; Krug et al., 1984 ; Muller et al., 2002 ; Yuste and Bonhoeffer, 2001 ; Nguyen and Kandel, 1996). Ainsi, à la fois la L-LTP et la mémoire à long terme sont dépendants de la synthèse protéique (Dudai, 2004 ; McGaugh, 2000).

b) Neurotransmission de la LTP

La transformation d'un signal excitateur pré-synaptique en un potentiel d'action post synaptique va faire intervenir les récepteurs au glutamate (Harris et al., 1984 ; Morris et al., 1986). Le potentiel d'action pré-synaptique va permettre la libération de glutamate dans la fente synaptique. Si le potentiel d'action est unique, la quantité de glutamate libérée dans la fente sera faible et la fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA ne permettra pas une entrée importante de Na^+ dans le neurone post-synaptique et ne conduira donc pas à l'ouverture des canaux calciques dépendant des récepteurs NMDA (figure 13A). Par contre, une stimulation à haute fréquence du neurone pré-synaptique, va entraîner la libération d'une quantité importante de glutamate dans la fente synaptique provoquant une entrée notable de Na^+ dans le neurone post-synaptique par les canaux dépendant des récepteurs AMPA. L'arrivée de sodium dans le neurone va provoquer une dépolarisation qui va libérer les récepteurs NMDA des ions magnésium qui bloquaient l'entrée du canal lié au récepteur

NMDA et la stimulation de celui-ci par le glutamate va permettre la pénétration de Ca^{2+} dans la cellule (figure 13B) (Nowak et al., 1984).

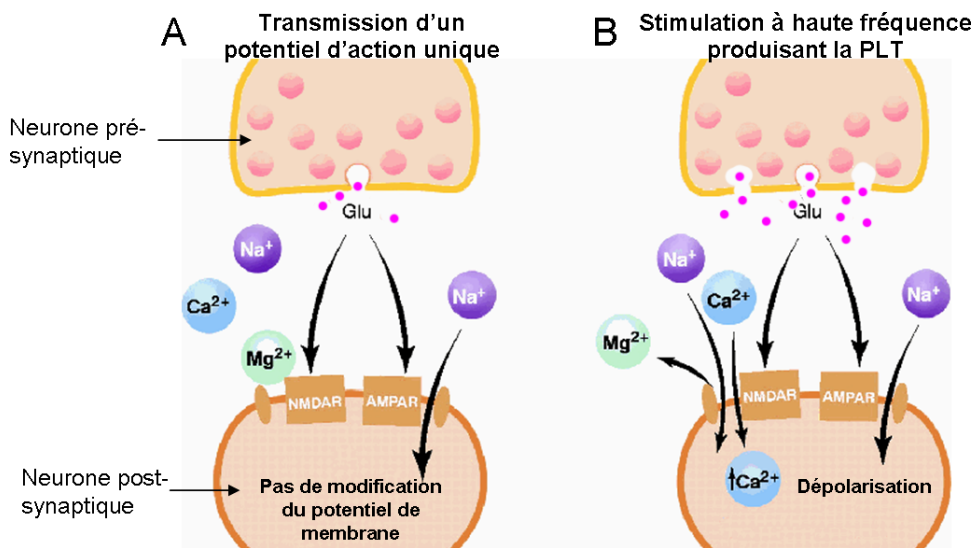


Figure 13 : Schéma de l'action du glutamate sur ses récepteurs dans le cadre d'une stimulation par un potentiel d'action pré-synaptique sur un neurone post-synaptique (adapté de Malenka and Nicoll, 1999).

Durant la transmission synaptique, le glutamate est libéré du bouton présynaptique et agit à la fois sur les récepteurs AMPA (AMPR) et sur les récepteurs NMDA (NMDAR). (A) Cependant, la transmission d'un potentiel d'action unique ne permet pas la libération d'une grande quantité de glutamate dans la fente synaptique. Ainsi, cela entraîne une entrée de Na^+ uniquement par les récepteurs AMPA, mais pas par les récepteurs NMDA, du fait de la présence de Mg^{2+} sur ces récepteurs. Cette entrée de Na^+ n'est alors pas suffisante pour modifier le potentiel de membrane post-synaptique. (B) Une stimulation à haute fréquence va déverser une quantité importante de glutamate dans la fente synaptique et permettre une dépolarisation entraînant la libération des ions Mg^{2+} des récepteurs NMDA permettant une entrée de Na^+ et Ca^{2+} dans l'épine dendritique par l'intermédiaire des canaux des récepteurs NMDA. L'élévation de la quantité de Ca^{2+} dans l'épine dendritique est à l'origine de la LTP.

c) Signalisation cellulaire impliquée dans la mémorisation suite à la potentialisation à long terme (LTP)

L'introduction de calcium va activer un grand nombre d'enzymes en modifiant leur conformation. C'est le cas de la PKC et de la calmoduline qui devient active lorsque quatre ions calcium s'y fixent (Malinow et al., 1989 ; Soderling et al., 2000). La calmoduline devient alors la Ca^{2+} -calmoduline, second messenger principal de la LTP (Lynch et al., 1983) capable d'activer à son tour d'autres enzymes qui jouent un rôle clé dans ce processus comme l'adénylate cyclase et la protéine kinase II calmoduline-dépendante (CaM kinase II). Ainsi, l'adénylate cyclase activée va produire de l'adénosine mono-phosphate cyclique (ou AMPc) qui catalyse à son tour l'activité d'une autre protéine, la kinase A (PKA). On sait par exemple que les récepteurs AMPA vont être phosphorylés par la PKA, leur permettant de rester ouverts plus longtemps suite à la fixation de glutamate (revue Carvalho et al., 2000). Ceci entraîne par conséquent une plus grande dépolarisation post-synaptique et contribue ainsi à l'établissement

de la LTP. Cette cascade intra-cellulaire va également conduire à l'activation de la voie des MAP Kinases (MEK-ERK), aussi bien *in vitro* (English and Sweatt, 1996 ; Coogan et al., 1999) qu'*in vivo* (McGahon et al., 1999 ; Davis et al., 2000). L'activation de cette voie ainsi que de la PKA va permettre l'expression de facteurs de transcription, comme CREB et Elk-1, qui sont phosphorylés et activés permettant la transcription de gènes, tels que *zif268*, *cFos*, et *BDNF*, qui vont modifier la structure et/ou les fonctions des synapses (Kandel, 2001 ; Shaywitz and Greenberg, 1999). La transcription des gènes dépendant de CREB conduirait également à la fabrication de nouveaux récepteurs AMPA et kainates susceptibles d'augmenter encore une fois l'efficacité synaptique (figure 14). A noter que bien que ces données suggèrent un rôle important des récepteurs AMPA/Kainates dans la LTP, ils ne sont pas cruciaux pour sa phase initiale d'induction (Kauer et al., 1988 ; Muller et al., 1988). De plus, ces récepteurs pourront être phosphorylés par la CaM kinase II dont l'activité est maintenue par autophosphorylation longtemps après que le calcium ait été évacué à l'extérieur de la cellule et que la Ca²⁺-calmoduline ait été désactivée. La CaM kinase II en phosphorylant les récepteurs AMPA et les MAP kinases permettrait la construction des dendrites, ou des récepteurs NMDA eux-mêmes dont la conductance au calcium augmenterait grâce à cette phosphorylation (Roche et al., 1996). C'est l'ensemble de ces paramètres qui vont être responsable de l'augmentation de la sensibilité des neurones post-synaptiques vis-à-vis du glutamate. Ainsi, la répétition de l'apprentissage d'une tâche va augmenter la sensibilité des neurones du circuit mis en jeu dans cette tâche et un potentiel d'action pré-synaptique de faible fréquence qui au début de l'apprentissage n'aurait pas déclenché d'activation post-synaptique, va ici permettre l'activation des neurones post-synaptiques.

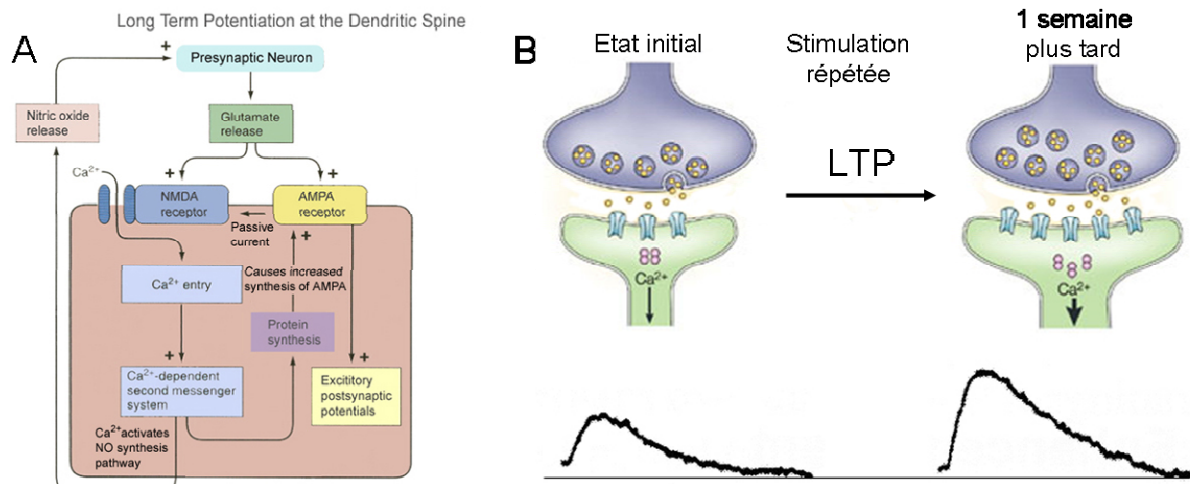


Figure 14 : La LTP augmente le nombre de récepteurs au glutamate au niveau du neurone post-synaptique augmentant la sensibilité électrophysiologique du neurone.

(A) Une quantité suffisante de glutamate permettant l'entrée de Ca^{2+} par les canaux dépendants du récepteur au NMDA dans la cellule va conduire à une synthèse protéique comprenant les récepteurs AMPA. (B) Ainsi la LTP, par stimulation répétée, augmente le nombre de récepteurs au glutamate. L'activation d'un plus grand nombre de récepteur avec une même quantité de glutamate permet une activation électrophysiologique plus forte du neurone (état initial versus 1 semaine plus tard).

d) Mécanismes impliqués dans l'acétylation des histones liés à la potentialisation à long terme (LTP)

Nous avons pu noter que la potentialisation à long terme est le mécanisme le plus important à l'origine de la plasticité synaptique et que la LTP pouvait être reliée à la mémoire à long terme (Malenka and Bear, 2004 ; Pittenger and Kandel, 2003), ainsi ces trois composantes sont étroitement corrélées.

Comme nous venons de le voir, la LTP entraîne une synthèse protéique et va donc nécessiter la mise en place d'une dynamique épigénétique. Par conséquent, des études se sont intéressées aux voies intra-cellulaires liées à la LTP et aux modifications épigénétiques qui en découlent dans un contexte d'apprentissage.

Plusieurs études ont montré que la régulation de mécanismes épigénétiques requise dans des processus de plasticité synaptique dépendait de signaux intracellulaires impliquant la cascade des MAPK (MEK-ERK) (English and Sweatt, 1997) qui vont permettre entre autre l'activation de CREB par phosphorylation (Levenson and Sweatt, 2006) (figure 15). Une fois CREB activée, CBP est recrutée permettant une activation transcriptionnelle par ses fonctions HAT et co-activatrices transcriptionnelles.

Il a été démontré qu'un conditionnement à la peur, comme la plupart des apprentissages impliquant la mémoire à long terme, requiert une transmission synaptique

dépendant des récepteurs NMDA via la cascade des MEK-ERK MAPK dans l'hippocampe (Atkins et al., 1998; Fanselow et al., 1994; Levenson et al., 2004; Rampon et al., 2000). En effet, l'inhibition aussi bien des récepteurs NMDA que de MEK bloque l'augmentation de l'acétylation de H3 provoquée par le conditionnement à la peur (Levenson et al., 2004). Les auteurs ont également activé directement les récepteurs NMDA dans l'hippocampe et cela a entraîné une augmentation des acétylations de l'histone H3 via la voie dépendante de ERK (Levenson et al., 2004). L'activation de la voie PKA par la forskolin ou la voie de PKC par l'ester de phorbol augmente aussi l'acétylation de l'histone H3 de manière dépendante de l'activité ERK. La nage forcée induit la phosphoacétylation de l'histone H3 par la voie des récepteurs NMDA et de ERK (Chandramohan et al., 2008). Maharana et al., (2010) ont trouvé que la dépolarisation induite par du KCl sur des tranches d'hippocampe, permet une acétylation de l'histone H2B qui est dépendante de l'activité ERK. Ainsi, la voie ERK qui est importante pour la plasticité synaptique et la mémoire aussi bien chez les mammifères que chez les invertébrés (Sweatt, 2001 ; Sharma and Carew, 2004) et qui a été proposée comme un nœud moléculaire (Reissner et al., 2006) régule la plasticité synaptique et la mémoire en modulant l'acétylation des histones en plus de réguler les facteurs de transcription et la synthèse protéique.

Il a également été démontré que la *mitogen and stress-activated protein kinase 1* (MSK1), qui agit en aval de ERK (figure 15), permettait de contribuer à la régulation épigénétique de la mémoire à long terme en agissant sur la phosphorylation de l'histone H3, mais également sur l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 dans CA1 de l'hippocampe (Chwang et al., 2006, 2007), confirmant les résultats précédents de Levenson (Levenson et al., 2004). Ces études ont été réalisées avec des tests de conditionnements à la peur. Mais une étude récente a pu montrer que cette voie des MAP kinase était également empruntée lors de tests d'apprentissage tel que la piscine de Morris. En effet, chez des rats et des souris, le test de la piscine de Morris entraînait, par l'intermédiaire de la signalisation NMDA-ERK, une activation de la *mitogen and stress-activated protein kinase 1* (MSK1) et de Elk-1 dans les neurones du gyrus denté conduisant à une phosphorylation de la serine 10 et à une acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 (Reul et al., 2009 ; Chandramohan et al., 2007).

La voie glutamatergique n'est pas la seule à exercer une action sur ces mécanismes épigénétiques, en effet la phosphorylation de l'histone H3 est augmentée en réponse à l'activation de nombreux neurotransmetteurs dans l'hippocampe, incluant la voie glutamatergique mais également la voie dopaminergique et cholinergique (Crosio et al., 2003)

(figure 15). La voie serotoninergique à également était impliquée dans la plasticité synaptique via des modifications épigénétiques. Un traitement par la serotonine (5-HT) sur des synapses sensorimoteurs permet l'induction de la facilitation à long terme, une forme persistante de plasticité qui entraîne un accroissement de la transmission synaptique (Brunelli et al., 1976). Inversement, l'exposition à un neuropeptide, le FMRFamide, entraîne une dépression à long terme qui correspond à une diminution durable de la transmission synaptique (Montarolo et al., 1988). Il a été découvert que l'acétylation de H4 à proximité du promoteur d'un gène précoce codant pour un facteur de transcription (ApC/EBP) était transitoirement augmenté par la 5-HT via le recrutement de CBP et transitoirement diminué après une exposition au FMRFamide (Guan et al., 2002).

On peut constater qu'un très grand nombre de systèmes (cholinergique, glutamatergique, dopaminergique, serotoninergique) sont impliqués dans les mécanismes épigénétiques entraînant des processus de plasticité synaptique et de mémorisation, via la voie des MAPK.

Cependant, des voies autres que celle des MAPK ont été étudiées dans la LTP. On vient de voir que la LTP agissait sur la phosphorylation des histones, celle-ci étant régulée par les protéines kinases (comme la MAP kinase) et les phosphatases. Or une étude récente a montré l'implication de la serine/threonine protein phosphatase 1 (PP1), qui est connu pour être un puissant suppresseur de la formation de la mémoire liée à la LTP dans l'hippocampe (Genoux et al., 2002 ; Munton et al., 2004 ; Koshibu et al., 2009 ; Gräff et al., 2010), dans le contrôle de plusieurs modifications post-traductionnelles des histones, comme la phosphorylation de la serine 10 de l'histone H3, mais également l'acétylation sur la lysine 14 de l'histone H3 et sur la lysine 5 de l'histone H4 ainsi que la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (Koshibu et al., 2011). L'action de PP1 sur l'acétylation des histones peut s'expliquer par l'association que forme PP1 avec des HDAC (Koshibu et al., 2009). De même, des études ont montré que l'inhibition des DNMT empêchent l'induction de la LTP et donc de la consolidation de la mémoire (Levenson et al., 2006 ; Miller and Sweatt, 2007). L'inhibition des DNMT bloque l'acétylation de H3 associée à la mémoire, dans un conditionnement à la peur, sans affecter la phosphorylation de ERK (Miller et al., 2008). Comme avec PP1, l'action des DNMT vont permettre le recrutement des HDAC via les *methyl CpG binding domain* (MBD), tel que MeCP2 qui se lie à l'ADN méthylé.

Ainsi, afin d'agir sur la LTP, d'un point de vue pharmacologique, on peut imaginer intervenir, non seulement sur la voie des MAP kinases, mais également sur les phosphatases

(comme PP1), ou sur les DNMT, ou encore comme nous le verrons sur la balance HAT / HDAC dans le but d'améliorer les déficits cognitifs de pathologies de la mémoire, telles que la MA.

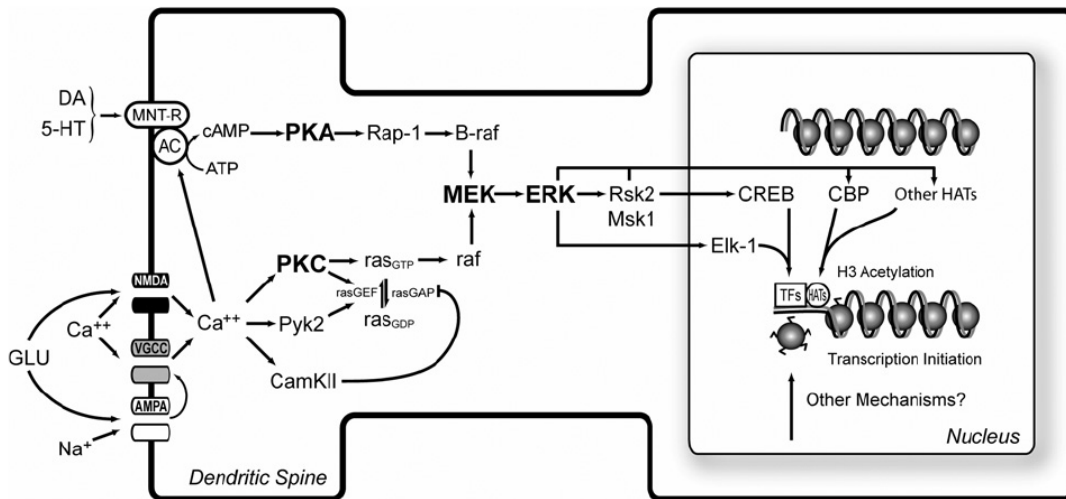


Figure 15 : Mécanisme de transduction du signal permettant de réguler la structure de la chromatine via l'acétylation des histones dans la formation de la mémoire à long terme.

Une grande variété de récepteurs cellulaires sont couplés à une cascade de signaux intracellulaires dans les neurones de l'hippocampe. Leur activation va activer ERK qui va moduler les activités de différents facteurs de transcription et de co-activateurs. L'action de nombreux facteurs de transcription et de co-activateur vont agir sur la structure de la chromatine via l'acétylation des histones. Ces changements de la structure de la chromatine vont mener à des activations transcriptionnelles de gènes impliqués dans la formation de la mémoire. *MNT-R*, *modulatory neurotransmitter receptor*; *VGCC*, *voltage-gated Ca²⁺ channel*; *AC*, *adenylate cyclase* (Levenson and Sweatt, 2006).

VIII. Présentation de 2 gènes impliqués dans les processus de mémorisation

A. Le *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF)

1) Présentation du BDNF

Le *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) est un membre de la famille des neurotrophines (comme le *nerve growth factor* NGF), lesquelles correspondent à de petites protéines sécrétées qui jouent un rôle important dans le développement du système nerveux des vertébrés (Bibel and Barde, 2000). A noter que c'est une molécule ubiquitaire, elle est présente aussi bien au niveau du système nerveux central que dans les tissus périphériques. Il s'agit d'une protéine basique fortement conservée entre les espèces et qui présente une grande homologie structurale avec le NGF.

Toutes les neurotrophines se lient au récepteur p75NGFR mais elles interagissent sélectivement avec leur propre récepteur protéine kinase à haute affinité de la famille trk (tropomyosin related kinase) (Kaplan and Miller, 2000 ; Tapia-Arancibia et al., 2004 ; Teng and Hempstead, 2004 ; Schweigreiter, 2006). Les effets biologiques du BDNF sont induits par TrkB et p75NGFR. La liaison de la protéine BDNF mature à TrkB et p75NGFR entraîne la survie cellulaire, l'accroissement neuritique, la transmission synaptique, la plasticité et la migration cellulaire (Dechant and Barde, 2002). Il est intéressant de noter, chez l'animal adulte, que le BDNF est exprimé partout dans le cerveau, avec les niveaux les plus hauts dans l'hippocampe (Yan et al., 1997).

La protéine précurseur non clivée du BDNF (proBDNF) a des caractéristiques de liaison différentes et a une activité biologique distincte par rapport à la protéine mature (Lee et al., 2001 ; Teng et al., 2005). Le pro-BDNF est un précurseur de 32kDa, qui subit un clivage en protéine mature de 14kDa ainsi qu'une forme tronquée du précurseur (28kDa). *In vitro*, le pro-BDNF peut être converti en BDNF mature par la plasmine et l'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue plasminogen activator* tPA) (Pang et al., 2004). Dans des études électrophysiologiques, le BDNF mature, mais pas le pro-BDNF, restaure la LTP tardive (L-LTP) dans des souris KO pour le tPA et le plasminogène (Pang et al., 2004). Ces études suggèrent que la conversion du pro-BDNF en BDNF mature permet l'expression de la LTP tardive dans l'hippocampe et fournit un lien mécanistique entre le tPA et le BDNF qui sont les seules protéines sécrétées impliquées dans la mémoire à long terme. De plus, le pro-BDNF

aurait une activité pro-apoptotique via la fixation sur les récepteurs p75NTR (Teng et al., 2005).

La liaison du BDNF à son récepteur de haute affinité entraîne la dimérisation de celui-ci, ce qui active son activité intrinsèque tyrosine kinase. Ceci conduit à l'autophosphorylation du dimère sur de multiples résidus tyrosines situés sur la partie cytoplasmique de la protéine transmembranaire. Ces résidus tyrosine phosphorylés représentent alors des sites de reconnaissance pour le recrutement de nombreuses protéines parmi lesquelles les enzymes Src, la phospholipase C γ (PLC γ), ou encore la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Schlessinger 2000 ; Pillai, 2008). Comme pour l'activation des récepteurs métabotropes du glutamate, la PLC va augmenter la production de diacyl glycerol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3) qui représentent des seconds messagers très importants dans la voie de signalisation du BDNF. En effet l'IP3 conduit à la libération des stocks intracellulaire de calcium et la DAG entraîne l'activation de la PKC (figure 16). L'induction de la PI3K va conduire à l'activation, entre autre, d'Akt, une kinase essentielle dans la transduction des signaux de survie (Huang and Reichardt, 2003 ; Pillai, 2008). La voie des MAPK va également être induite par l'activation du récepteur TrkB (figure 16). Or l'activation de toutes ces kinases va induire de nombreux facteurs de transcription, tel que CREB (Pillai, 2008) qui va réguler des processus clés comme la survie cellulaire et la plasticité cérébrale.

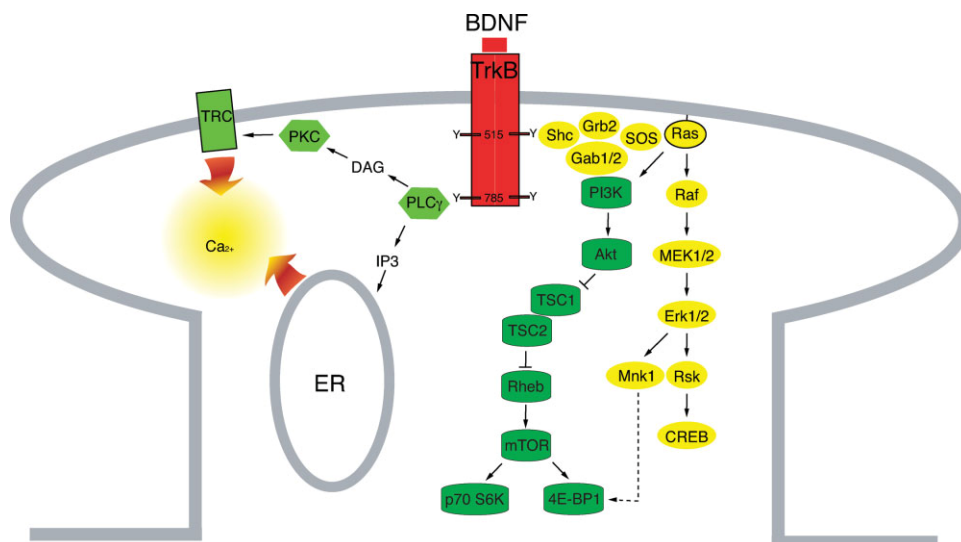


Figure 16 : La fixation du BDNF sur son récepteur active les voies de la PLC γ , PI3K et des MAPK (Yoshii and Constantine-Paton, 2010)

Le BDNF permet la survie et la différenciation de populations spécifiques de neurones embryonnaires *in vivo*, et il est aussi impliqué dans plusieurs fonctions chez l'adulte, incluant l'homéostasie neuronale et les processus liés à la plasticité du cerveau tel que l'apprentissage

et la mémoire (Tyler et al., 2002 ; Yamada et al., 2002). Le BDNF joue donc un rôle dans ces processus de plasticité synaptique, LTP et mémoire à long terme (Pang and Lu, 2004 ; Bamji et al., 2006 ; Bekinschtein et al., 2007) et notamment des études ont montré que cette protéine était impliquée dans les déclinis cognitifs (Peng et al., 2005) et était perturbée dans la MA. Plusieurs résultats ont confirmé qu'il y avait une baisse des ARNm du BDNF dans l'hippocampe et dans le cortex temporal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et suggère que la perte de BDNF peut contribuer à l'atrophie progressive des neurones dans la pathologie (Phillips et al., 1991 ; Fumagalli et al., 2006). La plupart des études sur l'expression du BDNF (tableau 1) ont été faite post mortem sur le cerveau de patients atteints de la MA versus des sujets sains (Connor et al., 1997; Fahnstock et al., 2002; Ferrer et al., 1999; Hock et al., 2000, Holsinger et al., 2000; Murray et al., 1994; Phillips et al., 1991).

Afin d'éviter les problèmes liés aux délais post-mortem des patients qui peuvent varier énormément d'une personne à l'autre et donc fausser les résultats, des études ont été faites sur le serum des patients. La concentration du BDNF dans le sérum varie tout au long du décours de la pathologie et est corrélé avec les démences sévères (Laske et al., 2007). Il a été démontré dans cette étude qu'à des stades précoces de la maladie, le BDNF était significativement augmenté par rapport au groupe contrôle, alors qu'à un stade avancé de la maladie, le BDNF était diminué. Cependant, une autre étude, avec plus de patients que la précédente n'a pas montré de différences de concentration de BDNF dans le sérum entre le groupe malade et le groupe sain (Ziegenhorn et al., 2007).

Tableau 1 : Variation du BDNF et des récepteurs Trk dans la maladie d'Alzheimer chez l'homme (Tapia-Arancibia et al., 2008)

| Conditions | Assay | BDNF and/or related molecules | Structure | Reference |
|----------------|--------------|---|--|---------------------------------|
| Post-mortem AD | Western blot | ↓BDNF ↓proBDNF | Parietal cortex | Peng et al. (2005) |
| Post-mortem AD | IHCC | ↓BDNF ↓BDNF | Hippocampus Temporal cortex | Connor et al., (1997) |
| Post-mortem AD | RT-PCR | ↓BDNF mRNA | Parietal cortex | Fahnestock et al. (2002) |
| Post-mortem AD | Western blot | ↓proBDNF | Parietal cortex | Michalski and Fahnestock (2003) |
| Post-mortem AD | RT-PCR | ↓BDNF mRNA | Parietal cortex | Holsinger et al. (2000) |
| Post-mortem AD | ELISA | ↔BDNF ↓BDNF ↔BDNF | Frontal cortex Parietal cortex Hippocampus Cerebellum | Hock et al. (2000) |
| Post-mortem AD | ELISA | ↑BDNF | Hippocampus | Durany et al. (2000) |
| Post-mortem AD | ELISA | ↓BDNF | Frontal cortex | Ferrer et al. (1999) |
| Post-mortem AD | ELISA | ↓BDNF ↔BDNF ↓BDNF ↔BDNF | Hippocampus Motor cortex Entorhinal cortex Dentate cortex | Narisawa-Saito et al. (1996) |
| Post-mortem AD | ISH | ↓BDNF mRNA | Hippocampus | Phillips et al. (1991) |
| Post-mortem AD | ISH | ↓BDNF mRNA | Hippocampus | Murray et al. (1994) |
| Post-mortem AD | ELISA | ↔BDNF | Serum | Ziegenhorn et al. (2007) |
| | ELISA | ↑BDNF (early AD) ↓BDNF (late AD) | Serum, CSF Serum, CSF | Laske et al. (2006) |
| | ELISA | ↓BDNF | Serum | Laske et al. (2007) |
| Post-mortem AD | ISH | ↑trk mRNA | Hippocampus | Connor et al. (1996) |
| | IHCC | ↑TrkA, ↑TrkB.FL and truncated receptors | | |
| | Western blot | | | |
| Post-mortem AD | Western blot | ↓TrkB ↔TrkB truncated | Frontal cortex and temporal cortex | Allen et al. (1999) |
| Post-mortem AD | RT-PCR | ↓trkA mRNA | Parietal cortex | Hock et al. (1998) |
| Post-mortem AD | IHCC | ↓TrkA, ↓TrkC ↔TrkB | Parietal cortex | Savaskan et al. (2000) |

Abbreviations: IHCC, immunocytochemistry; ISH, in situ hybridization; ELISA, two-site enzyme-immunoassay system; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; CSF, cerebral spinal fluid.

A noter, que Murer et collaborateurs ont démontré que dans le cerveau des patients atteints de MA, les neurones contenant des dégénérescences neurofibrillaires ne contiennent pas de BDNF, alors que les neurones dans lesquels le BDNF est présent, sont dépourvus de dégénérescence neurofibrillaire (Murer et al, 1999). Par contre, dans les plaques séniles de l'hippocampe de patients atteints de MA, ont été retrouvées de grandes quantités de récepteurs tronqués au BDNF (Connor et al., 1996).

Les études *in vitro* ont permis de montrer que les peptides A β modulaient l'expression des récepteurs TrkB (Olivieri et al., 2003), bloquaient la voie de transduction du BDNF (Ras/ERK ; PI3K/AKT) (Tong et al., 2001 ; 2004) ou encore la LTP (Vitolo et al., 2002 ; Chen et al., 2002). Ces études peuvent laisser penser que les processus impliqués dans la MA agissent plus ou moins directement sur la voie du BDNF.

2) Régulation du *bdnf*

La structure génomique du gène du *bdnf* est complexe, en effet, elle contient de nombreux promoteurs qui permettent la synthèse d'ARNm contenant différents exons non codant. Le gène du *bdnf* contient 8 exons non codant (notés exons I à VIII) chez les rongeurs et l'humain, chacun d'eux peut être épissé en exon codant la protéine (figure 17), et un exon (noté IX) situé en 3' codant le pro-BDNF (Aid et al., 2007). Chacun de ces exons non-codants possède un promoteur qui lui est spécifique, ce qui permet une régulation fine mais complexe de ce gène. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres exons non codant existent. Pour chaque transcrite du *bdnf*, un exon 5' est épissé en exon codant la protéine. Il a été montré que l'expression de quelques transcrits est spécifique de certains tissus (Tapia-Arancibia et al., 2004).

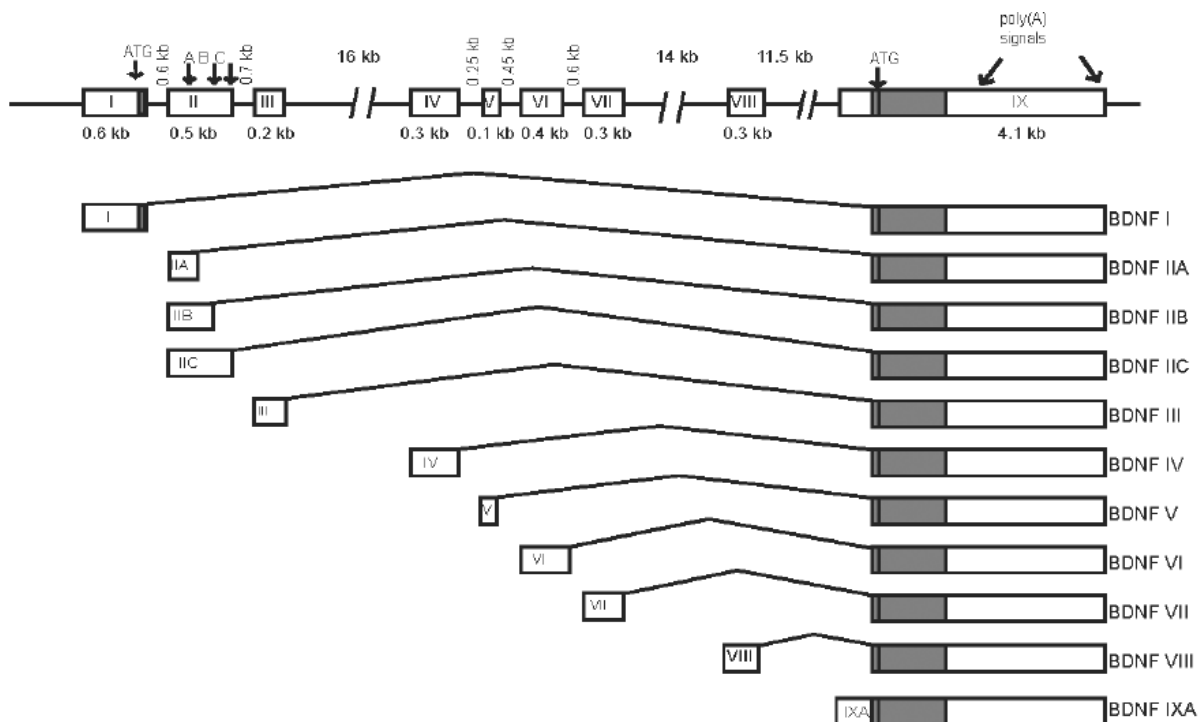


Figure 17 : Structure des Exons/Introns et les divers transcrits du gène du *bdnf* chez le rat et la souris. (Aid et al., 2007)

La représentation schématique des transcrits du *bdnf* sont montrés sous la structure du gène. Les régions codant la protéine sont représentées par les boîtes grises et les régions non traduites par les boîtes blanches. Chacun des 8 exons en 5' non traduits sont épissés en 3' au niveau de l'exon 9 codant la protéine. La transcription peut également être initiée dans l'intron avant l'exon codant la protéine, ce qui entraîne la transcription de l'ARN IXA, contenant l'exon codant étendu en 5'. Pour l'exon 2, trois différents transcrits IIA, IIB et IIC sont produits par trois épissages alternatifs de l'exon 2 (flèches A, B, C).

Un des promoteurs du *bdnf* le mieux caractérisé correspond à l'exon 3 du rat qui est identique à la séquence du promoteur IV du *bdnf* chez la souris (figure 18). Avec la

description de plusieurs nouveaux promoteurs, le promoteur de l'exon III a été renommé exon IV par Timmusk et collaborateurs (Aid et al., 2007).

L'induction de l'expression de l'exon IV du BDNF dans les neurones est sélectivement activée par l'influx de calcium et nécessite la fixation de CREB sur son site CRE (figure 18) (Shieh et al., 1998 ; Tao et al., 1998). Cependant, l'activation de CREB seule n'est pas suffisante pour permettre l'activation de la transcription à partir du promoteur IV du BDNF, elle nécessite également l'action de la CaM kinase IV. Le promoteur IV du BDNF est également dépendant de CaRF via sa fixation sur le site CaRE1 (Tao et al., 1998, 2002). L'E-box correspond au site CaRE2 et permet la liaison des facteurs de stimulations 1 et 2 (USF1/2) (Chen et al., 2003) (figure 18). Ces USF sont nécessaires à la transcription du promoteur IV du BDNF via l'activation de la CaRE2 et leur activité transcriptionnelle est stimulée par l'influx de Ca^{2+} dans les neurones.

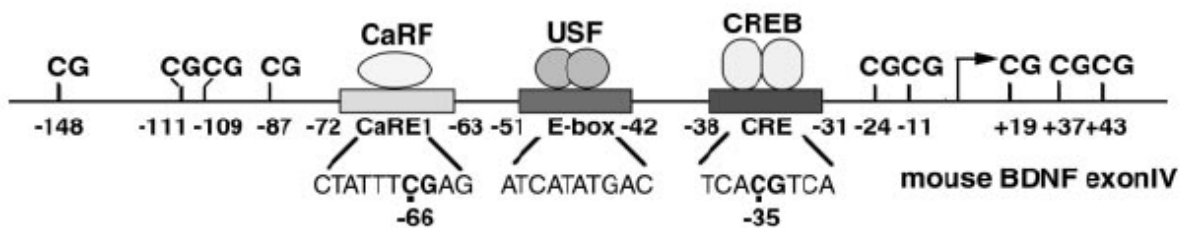


Figure 18 : Schéma décrivant les éléments régulateurs du promoteur de l'exon IV du *bdnf*

Le schéma du promoteur de l'exon IV de *bdnf* de souris présente un site Ca^{2+} -responsive elements : le CaRE 1 (5'-CTATTTGAG-3', localisé entre les paires de bases -72 et -63), ainsi qu'une E-box (5'-ATCATATGAC-3', localisée entre les bases -51 et -42) et un cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element (CRE : 5'-TCACGTCA-3', localisé entre les paires de bases -38 et -31). De plus il y a 8 sites CpG sur le promoteur de l'exon IV du *bdnf*. (Martinowich et al., 2003)

Des études *in vitro* et *in vivo*, réalisées essentiellement sur le cortex cérébral, l'hippocampe et l'hypothalamus, ont mis en évidence chez le rongeur que l'expression du BDNF est régulée par de nombreux neurotransmetteurs. De manière générale, comme nous venons de le voir, l'expression neuronale du BDNF est régulée par la voie calcique et est affectée par plusieurs stimuli, telle que la neurotransmission GABAergique, glutamatergique, cholinergique, dopaminergique et serotoninergique et la dépolarisation membranaire via la voie calcique (Tapia-Arancibia et al., 2004). Les auteurs ont également pu noter que le BDNF était régulé par de nombreuses hormones, telles que les œstrogènes, la progestérone, la testostérone, les glucocorticoïdes, et les hormones thyroïdiennes (Tapia-Arancibia et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que le BDNF est induit comme un gène précoce (*immediate early gene* IEG) après une activation neuronale (Marmigere et al., 2001), une stimulation par NMDA (Hughes et al., 1993) ou une stimulation électrique (Lauterborn et al., 1996). En effet, le BDNF est induit avec les autres gènes précoces et l'induction de ces IEG n'est pas nécessaire pour augmenter l'expression de l'ARNm du BDNF (Hughes et al., 1993). Il semblerait que la transcription du BDNF à partir du promoteur IV se fasse rapidement (30min) après un traitement au glutamate d'une culture de neurones hypothalamiques, mais les différents transcrits présentent des cinétiques distinctes (Marmigere et al., 2001). Des études *in vivo* dans l'hippocampe révèlent qu'une stimulation électrique rapide augmente les niveaux des transcrits du BDNF IV et ce malgré la préinjection de protéine inhibitrice de la synthèse protéique (Lauterborn et al., 1993). Ces résultats indiquent que le transcrit à partir du promoteur IV du BDNF est un IEG dans le système nerveux central.

Plusieurs études suggèrent la contribution des modifications des histones et la méthylation de certains promoteurs du BDNF pour réguler la transcription du gène du BDNF (Chen et al., 2003 ; Martinowich et al., 2003 ; Aid et al., 2007). Les modifications de la chromatine au niveau de promoteurs spécifiques du *bdnf* entraînent l'expression différentielle de variants épissés du *bdnf* dans un contexte de stimulation neuronale. Une dépolarisation de la membrane, qui peut être liée à la LTP et la mémoire à long terme, augmente la transcription dépendante du calcium de 2 transcrits du *bdnf* qui correspondent aux exons I et IV de la souris. En fait, dans les neurones, l'activation du gène du *bdnf*, à la suite d'une dépolarisation, s'effectue par une diminution de la méthylation des CpG du promoteur IV du *bdnf* et libère un complexe répresseur contenant la protéine MeCP2, les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et le co-répresseur mSin3A (Martinowich et al., 2003) (figure 19). Ainsi, le promoteur IV du *bdnf* passe d'une forme inactive à une conformation active de la chromatine.

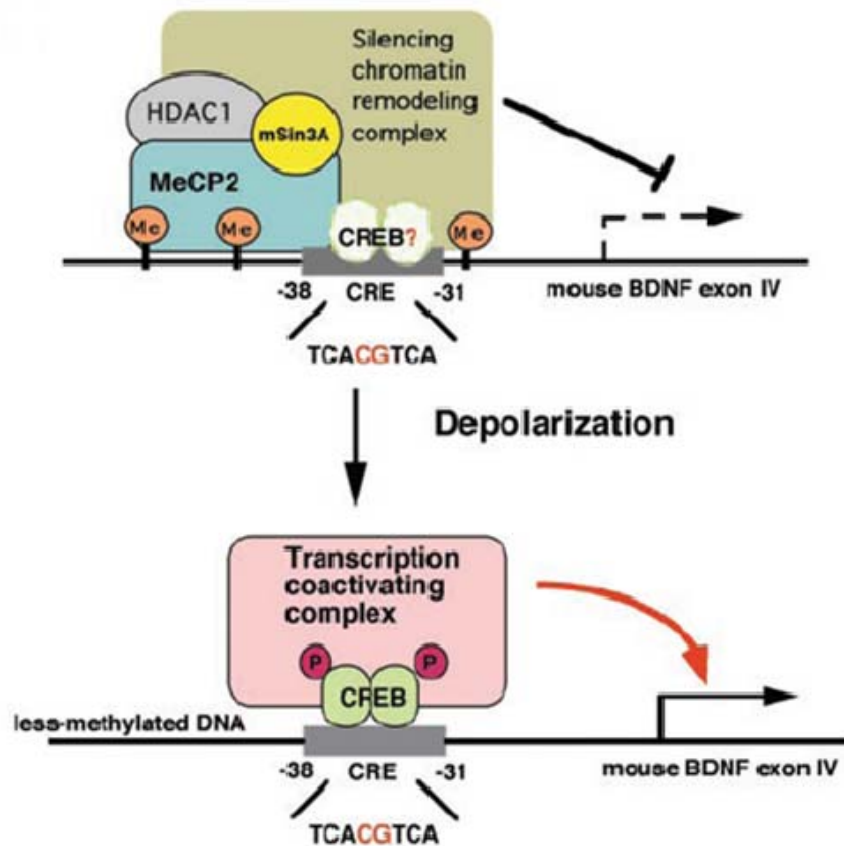


Figure 19 : Mécanisme proposé par Martinowich et collaborateurs, qui conduit au remodelage de la chromatine via la méthylation de l'ADN et qui permet la régulation de l'activité neuronale dépendant de l'expression du gène du *bdnf* (Martinowich et al., 2003).

L'ADN méthylié au niveau du promoteur IV du BDNF va recruter un complexe constitué de MeCP2, mSin3A et HDAC1. Ce complexe entraîne une répression transcriptionnelle de l'exon IV du BDNF. Une dépolarisation permet au promoteur IV du BDNF d'être moins méthylié, ainsi le complexe répresseur n'est pas recruté et l'activation de CREB sur son site CRE permet l'activation d'un complexe permettant une stimulation transcriptionnelle de l'exon IV du BDNF.

Ainsi, *in vivo*, dans un contexte d'apprentissage, une étude a montré qu'il y avait une baisse de la méthylation du promoteur IV du *bdnf* suite à un conditionnement à la peur (Lubin et al., 2008).

De plus, il a été montré que l'activité neuronale peut déclencher la phosphorylation du répresseur MeCP2, qui induit l'expression du BDNF et fournit un mécanisme possible de régulation de l'exon IV du BDNF après stimulation neuronale (Zhou et al., 2006). La phosphorylation de MeCP2, qui est dépendante de la CaM kinase II, va permettre la libération de MeCP2 de l'ADN, ainsi les complexes répresseurs comme les HDAC ne sont pas recrutés, permettant à la machinerie transcriptionnelle d'accéder aux gènes et d'activer la transcription du BDNF.

Plus récemment Lipsky et collaborateurs ont montré que l'exon 1 du *bdnf* était plus facilement régulé par les acétylations des histones que l'exon IV, et inversement l'exon IV

était plus facilement régulé par la méthylation de l'ADN que l'exon I, à la suite d'une stimulation des récepteurs NMDA (Tian et al., 2009).

L'ensemble de ces résultats montre l'implication de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones dans la régulation de la transcription du BDNF à partir de l'exon IV, dans des processus mis en jeu dans la mémorisation.

B. Zif268

Le gène de *zif268* fait partie des gènes précoces (*immediate early genes IEGs*). C'est une classe de gènes qui est rapidement et transitoirement activée en réponse à l'activation neuronale. Ces gènes ne nécessitent pas de synthèse protéique pour être activés et après leur activation, ils peuvent à leur tour activer des cibles en aval. Selon Lanahan et Worley (1998) environ 30 à 40 gènes sont des IEGs neuronaux et parmi ceux-ci 10 à 15 sont des gènes régulateurs tels que *cFos* et *zif268*, les autres étant des gènes effecteurs comme le BDNF.

1) Présentation de *zif268*

Zif268 est aussi connu sous le nom de *Krox24*, *NGFI-A*, *Egr-1*, *TZS8* et *Zenk*. *Zif268* a été découvert comme gène précoce suite à sa réponse par un traitement au NGF (*nerve growth factor*) dans la différenciation neuronale et durant les processus mitotiques (Christy et al., 1988 ; Sukhatme et al., 1988). Le gène code des protéines de 82 et 88kDa, en fonction de la séquence d'initiation (Lemaire et al., 1990) et sa caractéristique prédominante est d'avoir 3 séquences en doigt de zinc dans le domaine se liant à l'ADN qui permet à la protéine de réguler la transcription d'autres gènes (Christy and Nathans, 1989a ; Swirnoff et al., 1995).

Dans le cerveau de rat, l'expression constitutive de l'ARNm de *zif268* est trouvée dans le néocortex, les cortex olfactifs primaires et entorhinal, les noyaux amygdaliens, le noyau accumbens, le striatum, le cortex cérébelleux et l'hippocampe. Dans ce dernier, *Zif268* est fortement exprimé dans CA1 et plus faiblement dans CA2, avec une expression négligeable dans le gyrus denté (Schlingensiepen et al., 1991).

2) Régulation de *zif268*

Sur la région promotrice de *zif268* ou aux alentours de cette région, il y a plusieurs sites régulateurs différents, comme 2 sites CRE, 6 sites SRE, un motif SP1-like, des

séquences CCAATT, des motifs AP-1-like et AP-2-like (Tsai-Morris et al., 1988 ; Changelian et al., 1989 ; Christy and Nathans, 1989b). Il y a aussi des boîtes GSG, correspondant à un motif consensus GCG(G/T)GGGGCG, qui se lie aux protéines Egr (Christy and Nathans, 1989a ; Cao et al., 1993), suggérant que plusieurs voies de signalisation et kinases peuvent transcrire *zif268*, incluant les protéines de sa propre famille. Ces sites sont les cibles de différentes kinases et d'autres facteurs de transcription, par exemple Elk-1 se lie aux sites SRE, tandis que CREB se lie aux sites CRE et la présence d'un motif proche de l'AP-1 va permettre également la liaison de l'hétérodimère Fos-Jun. La possibilité pour *zif268* de se lier sur la séquence GSG lui confère une propriété d'autorégulation (Beckmann and Wilce, 1997 ; Herdegen and Leah, 1998). Plusieurs études ont montré *in vivo* et *in vitro* que la régulation de l'expression des ARNm de *zif268* est initiée via l'activation de différents récepteurs qui incluent tous les sous-types des récepteurs glutamatergiques, dopaminergiques, adrénérgiques, et les récepteurs aux opiacés (Hughes and Dragunow, 1995 ; Beckmann and Wilce, 1997). Dans la plasticité synaptique, les études *in vivo* ont souligné l'importance de la voie des MAP kinases dans la régulation de la voie de *zif268* par les sites SRE et/ou CRE, via les facteurs de transcriptions Elk-1 et CREB, respectivement (Davis et al., 2000). Cependant dans des souris mutantes $\alpha\delta$ CREB les niveaux constitutifs de *Zif268* sont normaux, et les auteurs ont réussi à augmenter les niveaux d'ARNm de *zif268* par l'injection d'acide kainique, suggérant que CREB n'est pas un facteur critique pour la régulation de *zif268*. Ils suggèrent que la régulation de *zif268* peut être compensée par le facteur de transcription CREM (Blendy et al., 1995), cependant au moins 4 sites SRE ont montré qu'ils étaient capables de réguler individuellement la transcription de *zif268* (Janssen-Timmen et al., 1989 ; Christy and Nathans, 1989b), suggérant par conséquent que le facteur de transcription Elk-1 peut jouer un rôle critique dans la régulation de *zif268*.

Il est important de noter que la transcription de *zif268* est régulée durant le processus de plasticité synaptique (Cole et al., 1989 ; Wisden et al., 1990) et qu'elle est corrélée avec la LTP (Richardson et al., 1992 ; Abraham et al., 1993). Il apparaît que *zif268* est rapidement régulé durant différentes tâches d'apprentissage, telles que des tâches d'apprentissages liées à la peur chez des rats (Rosen et al., 1998 ; Hall et al., 2001) et dans des tâches d'apprentissage spatial chez le rat (Guzowski et al., 2001).

OBJECTIFS

Ce travail vise à comprendre certains mécanismes moléculaires associés à la formation d'une mémoire, afin de pouvoir envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des déficits mnésiques associés à la maladie d'Alzheimer (MA).

La MA est une maladie neurodégénérative liée à l'âge. C'est une maladie évolutive qui va conduire à la démence. D'un point de vue anatomopathologique elle se caractérise par des plaques amyloïdes constituées de peptides A β générés par clivage protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP) et d'une tauopathie (dégénérescences neurofibrillaires contenant la protéine Tau anormalement phosphorylée), ainsi que par une mort neuronale massive. Chez les patients atteints de MA, on note des dégénérescences notamment dans la région hippocampique (Mattson, 2000). Cette dégénérescence est décelable par IRM précocement dans la pathologie (Stoub et al., 2005 ; deToledo-Morrell et al., 2004) et pourrait être liée non seulement aux dysfonctions cholinergiques dans le cerveau basal antérieur (Parihar and Hemnani, 2004), mais également à une mort neuronale dans le cortex entorhinal qui débute à un stade précoce de la maladie avant même l'atteinte de l'hippocampe (Pennanen et al., 2004; Stoub et al., 2005; deToledo-Morrell et al., 2004). La région hippocampique et plus particulièrement l'hippocampe dorsal participe à l'établissement de la mémoire à long terme et notamment de la mémoire spatiale (pour revue Fanselow and Dong, 2010). En effet, dans la maladie d'Alzheimer les perturbations neurologiques de l'hippocampe sont à l'origine des premiers troubles mnésiques et notamment de la désorientation spatiale.

Ainsi, dans la pathologie, nous nous sommes intéressés à certains mécanismes qui sous-tendent les processus de mémorisation et qui pourraient être touchés dans la MA.

D'un point de vue cellulaire et moléculaire, un apprentissage impliquant la mémoire spatiale va nécessiter l'induction de la LTP ou encore le remaniement et la formation synaptique qui sont des processus qui vont requérir une synthèse protéique. La production protéique provient de la traduction de protéines à partir des ARN nouvellement synthétisés. Ceux-ci sont engendrés par des mécanismes transcriptionnels. Il est maintenant bien établi que les régulations transcriptionnelles des gènes reposent sur l'état conformationnel de la chromatine. Or, il a été démontré dans le cas de la mémorisation, une implication de l'acétylation des histones dans la transcription de gènes impliqués dans la formation et dans la consolidation de la mémoire (Graff and Mansuy, 2009). La régulation de ces acétylations s'effectue grâce à des histones acétyltransférases (HAT) et des histones déacétylases (HDAC). Comme nous avons pu le voir en introduction de nombreuses études montrent l'implication d'une HAT particulière : la *CREB-binding protein* (CBP) dans la formation de la mémoire à long terme.

Dans un premier temps (chapitre 1), nous avons étudié l'expression de CBP et d'autres HAT, ainsi que les niveaux d'acétylations des histones dans l'hippocampe de rats qui sont en train de consolider une tâche d'apprentissage spatiale en piscine de Morris. Ce test nécessite la consolidation de la trace mnésique dans la structure hippocampique : c'est un test dans lequel les animaux (des rats Long-Evans) doivent apprendre et se souvenir de la localisation d'une plateforme refuge, laquelle est immergée dans l'eau et non visible. Afin de réaliser cette tâche, les animaux doivent s'aider des indices situés dans l'environnement de la pièce (radiateur, chaise, armoire...), dans laquelle se trouve la piscine, pour retrouver la plateforme. Ce test est basé sur le fait que l'eau est un milieu aversif pour les rats. Ceux-ci vont donc chercher à s'extraire de ce milieu, en apprenant la localisation de la plateforme pour s'y réfugier. Dans le cas d'un apprentissage spatial, tel que la piscine de Morris, l'acquisition est un phénomène graduel. Le début de l'apprentissage met en jeu la mémoire à court terme et la consolidation s'effectue grâce à une répétition de la tâche d'apprentissage. Lors de l'acquisition, les rats qui apprennent la localisation de la plateforme s'améliorent au fur et à mesure des jours d'entraînement. En général, dans le cas de la piscine de Morris, la mémorisation de la tâche d'apprentissage est formée et efficace lorsque les animaux ne s'améliorent plus aux cours des essais. Notre objectif était de caractériser les événements liés aux acétylations (les profils d'acétylation des histones et de HAT) au niveau des cellules hippocampiques de rat durant la phase précoce de la consolidation de la mémoire spatiale. Ainsi, nous avons déterminé dans nos conditions expérimentales, que le moment où la consolidation de la mémoire est efficace débute à partir du 3^{ème} jour d'apprentissage. Nous avons donc évalué, à cette étape de l'apprentissage, l'implication de CBP (et d'autres HAT), ainsi que des acétylations des histones, dans la formation de cette mémoire spatiale au niveau de l'hippocampe dorsal de ces rats. Nous avons pu déterminer 2 points importants : tout d'abord, une augmentation de l'expression de CBP dans l'hippocampe dorsal durant la formation de la mémoire spatiale. L'autre point important de cette étude est que l'apprentissage spatial induit une augmentation de l'acétylation des histones H4 et H2B dans l'hippocampe. Par la suite, nous avons essayé de déterminer si ces mécanismes impliquant les acétylations étaient perturbés dans un modèle de rat présentant une dénervation de l'hippocampe. Ce modèle se base sur les dysfonctions cholinergiques et la mort neuronale dans le cortex entorhinal observés au cours de la MA. Les rats ont ainsi subi une destruction des neurones cholinergiques du cerveau basal antérieur et des neurones glutamatergiques du cortex entorhinal induisant une destruction des projections cholinergiques et glutamatergiques aboutissant à l'hippocampe. Ainsi, ce modèle de rat, à la suite de ces deux lésions, présentent

de graves défauts de mémorisation (Traissard et al., 2007). Nous avons donc cherché dans ce modèle, à savoir si les mécanismes que nous avons décrits dans un processus normal d'apprentissage spatial étaient perturbés dans l'hippocampe des animaux lésés. Ainsi, nous avons pu déterminer que CBP et les acétylations des histones n'étaient pas recrutées au cours du test d'apprentissage spatiale en piscine de Morris, expliquant probablement les déficits de consolidation de mémoire à long terme de ces rats. L'ensemble de ces résultats a été objectivé par une publication dans *Neuropsychopharmacology*.

Dans un deuxième temps (chapitre 2), nous avons voulu savoir si les mécanismes d'acétylations retrouvés lors de la consolidation de la mémoire spatiale existaient déjà au début du test d'apprentissage alors que les animaux n'ont pas encore consolidé la tâche. Ainsi, nous avons étudié ces mécanismes dans l'hippocampe des rats ayant suivi 1 jour d'apprentissage en piscine de Morris. Nous avons pu comparer ces modifications d'acétylation à celles retrouvées dans l'hippocampe des rats qui sont en train de consolider la localisation de la plateforme (3 jours d'apprentissage) et ces premiers résultats préliminaires, nous ont permis de découvrir que les profils d'acétylation des histones étaient similaires à 1 jour et 3 jours d'apprentissage.

Enfin, dans un troisième chapitre, je vous présenterai nos premiers résultats sur l'implication de la voie glutamatergique (via les récepteurs NMDA) sur la modulation de l'acétylation des histones. Nous nous sommes intéressés à cette voie car d'après la littérature et nos résultats (rats lésés), elle joue un rôle important dans les processus de mémorisation par l'intermédiaire de l'acétylation des histones (cf E. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliquées dans la mémorisation). Ainsi, nous avons traité des neurones en culture avec du NMDA à différents temps et différentes doses afin d'évaluer son action sur ces mécanismes d'acétylation des histones. Nous avons notamment pu déterminer que le NMDA entraînait une activation différentielle des profils d'acétylations entre H2B et H3.

Ces résultats nous permettront de mieux comprendre par quels mécanismes s'effectuent la formation de la mémoire et nous conduiront à trouver des marqueurs qui pourront servir de cibles pharmacologiques afin de restaurer les fonctions cognitives des patients atteints de MA. Les perspectives thérapeutiques qui découlent de ces résultats seront exposées dans la conclusion générale.

Pour finir, je présente en annexe une revue pour laquelle j'ai participé, sur l'implication des inhibiteurs des histones déacétylases dans les maladies du motoneurone.

RESULTATS

CHAPITRE 1

Article :

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

Olivier Bousiges, Anne Pereira de Vasconcelos, Romain Neidl, Brigitte Cosquer, Karine Herbeaux, Irina Panteleeva, Jean-Philippe Loeffler, Jean-Christophe Cassel and Anne-Laurence Boutillier

Neuropsychopharmacology 2010 Dec;35(13):2521-37.

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

Olivier Bousiges^{1,2,3}, Anne Pereira de Vasconcelos⁴, Romain Neidl^{1,2}, Brigitte Cosquer⁴, Karine Herbeaux⁴, Irina Panteleeva^{1,5}, Jean-Philippe Loeffler^{1,2}, Jean-Christophe Cassel⁴ and Anne-Laurence Boutillier^{*1,2}

¹Inserm, U692, Laboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence, Strasbourg, France; ²Laboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, UMRS692, Strasbourg, France; ³Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁴LINC FRE3289, Institut Fédératif de Recherche IFR 37, Université de Strasbourg-CNRS, GDR CNRS 2905, Strasbourg, France

Numerous genetic studies have shown that the CREB-binding protein (CBP) is an essential component of long-term memory formation, through its histone acetyltransferase (HAT) function. E1A-binding protein p300 and p300/CBP-associated factor (PCAF) have also recently been involved in memory formation. By contrast, only a few studies have reported on acetylation modifications during memory formation, and it remains unclear as to how the system is regulated during this dynamic phase. We investigated acetylation-dependent events and the expression profiles of these HATs during a hippocampus-dependent task taxing spatial reference memory in the Morris water maze. We found a specific increase in H2B and H4 acetylation in the rat dorsal hippocampus, while spatial memory was being consolidated. This increase correlated with the degree of specific acetylated histones enrichment on some memory/plasticity-related gene promoters. Overall, a global increase in HAT activity was measured during this memory consolidation phase, together with a global increase of CBP, p300, and PCAF expression. Interestingly, these regulations were altered in a model of hippocampal denervation disrupting spatial memory consolidation, making it impossible for the hippocampus to recruit the CBP pathway (CBP regulation and acetylated-H2B-dependent transcription). CBP has long been thought to be present in limited concentrations in the cells. These results show, for the first time, that CBP, p300, and PCAF are dynamically modulated during the establishment of a spatial memory and are likely to contribute to the induction of a specific epigenetic tagging of the genome for hippocampus-dependent (spatial) memory consolidation. These findings suggest the use of HAT-activating molecules in new therapeutic strategies of pathological aging, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative disorders.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 1 September 2010; doi:10.1038/npp.2010.117

Keywords: hippocampus-dependent memory; CREB-binding protein CBP; histone acetyltransferase; H2B histone; Morris water maze; memory consolidation

INTRODUCTION

What we are is defined by the memories we keep from our past experiences. Since Müller and Pilzecker (1900), it has been clear that such memories are not formed instantaneously. Initially labile and sensitive to interference, they

consolidate gradually over time to become stable and resistant. This consolidation process is orchestrated by molecular events, which have long-term consequences—structurally and functionally—at both system and cellular levels. At the system level, the hippocampus is a crucial conductor of the process, receiving and, within a protracted dialog involving other cortical regions, reorganizing the recently learned material in order to form a lasting memory trace (Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005; Fanselow and Dong, 2010). A prerequisite to systemic consolidation is that particular brain regions engaged in acquisition, such as the hippocampus, firstly integrates the signal by engaging synaptic or cellular

*Correspondence: Dr A-L Boutillier, Laboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Inserm U692, UMRS692, 11, rue Humann, Strasbourg 67085, France, Tel: +33 36 885 3082, Fax: +33 36 885 3065, E-mail: laurette@unistra.fr

⁵Current address: Diagenode SA, Avenue de l'Hôpital, Liège, Belgium
Received 22 April 2010; revised 8 July 2010; accepted 8 July 2010

consolidation. It occurs early after training and involves subcellular events that follow different timescales (Medina *et al*, 2008). It is long known that this step depends on transcriptional activation and *de novo* protein synthesis (Kandel, 2001; McGaugh, 2000), but the mechanisms underlying synaptic consolidation remain to be established.

Histone acetyltransferases (HATs) are key enzymes regulating the chromatin structure to promote gene transcriptional activation through histone acetylation. Many genetic studies point to a particular HAT, the co-activator CREB-binding protein (CBP) as a major contributor to memory formation (reviewed by Barrett and Wood, 2008). Haploinsufficient mice (*cbp +/−*) were shown to present chromatin acetylation reductions, late phase of hippocampal long-term potentiation (L-LTP) defects, and some forms of long-term memory (LTM) deficits (Alarcon *et al*, 2004). Spatial- and temporal-restricted expression of a HAT activity-deficient mutant of CBP showed the importance of HAT activity in these processes (L-LTP and LTM formation) (Korzus *et al*, 2004). Accordingly, several studies evidenced histone acetylation modifications in response to memory formation, in particular on H3 and H4 histones (reviewed by Gräff and Mansuy, 2008 and Roth and Sweatt, 2009). Several domains of CBP, such as the amino terminus (Bourtchouladze *et al*, 2003; Wood *et al*, 2005) or the KIX transcription factor-binding site (Wood *et al*, 2006a; Vecsey *et al*, 2007), have been defined important for synaptic plasticity and LTM. In addition, other related proteins displaying HAT function, such as E1A-binding protein p300 (p300) and p300/CBP-associated factor (PCAF), were recently implicated in memory processes as well (Oliveira *et al*, 2007; Maurice *et al*, 2008).

To further illuminate the role of HATs in memory, attempts to pharmacologically enhance histone acetylation levels have been made. This was made possible through the development of histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACi) (Dokmanovic *et al*, 2007). HDACi molecules have been successful in enhancing memory-related functions such as LTP (Levenson *et al*, 2004; Alarcon *et al*, 2004), or improving memory processing involved in cued or contextual fear conditioning (Bredy *et al*, 2007; Bredy and Barad, 2008; Lattal *et al*, 2007; Vecsey *et al*, 2007; Fischer *et al*, 2007), spatial learning in the Morris water maze (MWM) (Fischer *et al*, 2007; reviewed by Barrett and Wood, 2008 and Grissom and Lubin, 2009), or novel object recognition (Stefanko *et al*, 2009). Importantly, this strategy also worked in mice subjected to experimental brain damage (Fischer *et al*, 2007; Dash *et al*, 2009). The molecular mechanisms underlying these effects is not clear, but is based on the hypothesis that, if 'global' acetylation levels are increased and/or the activated-acetylation status of histones is maintained over time, this could potentially induce genetic programs at least partly related to memory and then sustain or enhance memory functions. Recently, HDAC2 was found associated with promoters of genes implicated in synaptic plasticity and memory formation, and *Hdac2* knockout mice show memory improvement (Guan *et al*, 2009). Such findings are important to guide the development of new specific HDACi molecules. It is worth noting that different class I HDACi were recently found to be efficient in restoring some memory functions in animal models of Alzheimer's disease (AD) (Ricobaraza *et al*, 2009;

Francis *et al*, 2009; Kilgore *et al*, 2010). Importantly, Vecsey *et al* (2007) showed that the memory-enhancing effects of HDACi were dependent on the CBP pathway. Such data further emphasize that KIX-interacting transcription factors like CREB recruit CBP HAT activity in the hippocampus during memory formation.

Despite the evidence suggesting that HATs contribute to memory formation and that HDACs enhance some memory functions, a clear picture of HAT enzyme modulation during the ongoing process of memory formation—and more particularly during a consolidation phase—is still lacking. Indeed, their expression profile has never been investigated during the formation of a memory. This is likely because a particular modification occurring in perhaps only a subregion of the hippocampus, which represents a mixed cellular population, will probably come up very discretely at the global level. In this report, we conducted a thorough examination of the four core histones' acetylation pattern, as well as the expression profile of different HATs, in the rat dorsal hippocampus during the ongoing phase of spatial memory formation in an MWM task. We focused on the dorsal hippocampus because this hippocampal subregion, unlike the ventral one, has a crucial role in spatial memory functions (Fanselow and Dong, 2010). Taken together, our data reveal a dynamic upregulation of the HAT enzymes during the formation and consolidation of a memory trace. This newly generated HAT activity is likely to further ensure specific acetylated-histone-dependent events, in particular on H4 and H2B histones, which we found to be regulated on memory/plasticity-related genes during the ongoing process of memory formation. In addition, regulations of CBP and histone acetylation were lost in a rat model of hippocampal denervation presenting two major degenerative features found in AD, namely neuronal loss in the basal forebrain (BF) and the entorhinal cortex (EC), and in which spatial memory consolidation does not occur (Cassel *et al*, 2008; Traissard *et al*, 2007). Our findings emphasize that spatial memory dysfunctions, as seen in AD, could be the result of altered genetic (CBP expression) and epigenetic (histone acetylation) regulations in the hippocampus, otherwise controlled by these neuronal inputs (ie, glutamatergic and cholinergic). This work opens the interesting possibility of reinstating memory consolidation processes by directly modulating the expression of specific HATs during neurodegenerative conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study adhered to the regulations specified by the European Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (authorization no. 67-215 for J-CC and no. 67-7 for APV). Male Long-Evans rats ($n = 126$), about 3–4 months old at the time of behavioral testing, were used. They were housed individually in a quiet room, under a 12 h light/dark cycle (light on at 0700 hours) with *ad libitum* access to food and water. For animal surgery and histological verifications in double lesion model, see Supplementary Materials and methods.

Spatial Testing in the MWM

The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Traissard *et al*, 2007). Briefly, for all rats, the first part of training was a four-trial session per day using a visible platform (VPf) located in the south-east quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. In the rats that were subjected to surgery (lesions and sham), training with the VPf was performed over 2 days, with four trials each day. The learning rats (hidden platform (HPf) group) were then given four successive acquisition trials per day (inter-trial interval, 10–15 s), starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, for 1–5 consecutive days to learn the location of a platform hidden 1 cm below the water surface in the north-west quadrant. The distance traveled before reaching the platform was recorded by a video tracking system (Ethovision, Noldus, the Netherlands). Control rats (VPf group) were swimming toward a VPf, of which the location was changed from trial to trial on each day to make sure rats did not associate a spatial cue with the platform. In the lesion experiments, control rats were sham-operated rats that had to learn the location of an HPf. At the end of acquisition, all rats trained with the HPf were tested for retention in a probe trial administered 1 h after the last acquisition trial. The platform was removed and all rats from the HPf group were released from the north-east start point and given 60 s to swim. The variable taken into account for the probe trial was the time spent in each of the four quadrants. Control groups (VPf) had to swim to a VPf during the probe trial, as previous experiments showed that removing the platform after training with a VPf was an extremely stressful experiment.

Statistical Analyses (Behavioral Studies)

Performance recorded during acquisition was evaluated using a two-way ANOVA with repeated measures considering days (1–3 or 1–5) and platform visibility HPf (learning) vs VPf (control), or treatment (sham vs lesion) as factors. Probe trial performance was analyzed using a one-way ANOVA or/and *t*-test to compare the time spent in the target quadrant to chance (ie, 15 s). When appropriate, *post hoc* comparisons used the Newman–Keuls multiple range statistic. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Preparation of Tissues for Biochemical Studies

Animals were decapitated and their brains rapidly removed from the skull and transferred on ice. For rats of the MWM experiments, euthanasia occurred right after the end of the probe trial (HPf) or the one-trial session to the VPf. Different rat groups have been made for each different preparation of tissues. Freshly dissected tissues were then immediately frozen at -80°C , until being processed for biochemical studies (RNA, total protein, and histone extractions) or were immediately processed (chromatin and nuclear protein extractions). In each experiment, the cerebellum was used as control tissue.

Real-Time Reverse Transcription-PCR

Total RNA was extracted from hippocampal tissues using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Samples were homogenized in a Tissue Lyser (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNAs were ethanol-precipitated twice. Only RNA samples with optical density (OD)260/280 and OD260/230 ratio close to 2.0 in TE (pH 8.0) were selected for reverse transcription ($n=5$ in each group). RNA samples were denatured 10 min at 70°C and cDNA synthesis was performed on 1 μg of total RNA (iScript cDNA Synthesis kit; Bio-Rad, Marne La Coquette, France). Quantitative PCR (qPCR) analysis was carried out on a Bio-Rad iCycler System using iQSYBR Green Supermix. A specific standard curve was performed in parallel for each gene, and each sample was quantified in duplicate ($n=5$). PCR conditions were 3 min at 94°C , followed by 40 cycles of 45 s at 94°C and 10 s at 60°C . Data were analyzed using the iCycler software, and normalized to the 18S ribosomal subunit RNA. Informations with regard to primers and PCR products are presented in Supplementary Materials and methods.

Protein Preparation and Western Blot Analyses

Total protein preparation. Tissues were lysed and homogenized in Laemmli buffer. After 10 min at 70°C , samples were sonicated for 10 s (Ultrasonic Processor, power 60%), boiled 5 min, centrifuged (20 000 g, 5 min), and supernatant frozen at -20°C .

Histone extraction. All procedures were performed on ice. Frozen tissues (15–20 mg) were incubated in 500 μl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 6.5), 50 mM sodium bisulfite, 1% Triton, 10 mM MgCl_2 , 8.6% sucrose). Protease inhibitor cocktail and sodium butyrate (1 mM) were added before use. Samples were homogenized with Dounce glass homogenizer for 10 strokes. Tissue homogenates were centrifuged (7700 g, 1 min, 4°C). Histones were acid extracted from the nuclear fraction in 150 μl of 0.4 N H_2SO_4 , sonicated for 10 s (Ultrasonic Processor, power 40%), and then incubated 1 h at 4°C . Acid extracts were centrifuged at 14 000 g for 10 min. Histones (supernatant) were transferred to a fresh tube and precipitated with 1.5 ml acetone over night at -20°C . The resulting purified proteins were resuspended in Laemmli buffer.

Nuclear protein extractions were prepared according to Dignam *et al* (1983). Briefly, the regular protocol is followed until the nuclear pellets are collected in buffer C, supplemented with protease inhibitor cocktail and sodium butyrate (1 mM). They are then softly dounce homogenized, and after centrifugation, the soluble nuclear fraction is quickly frozen and kept at -80°C . DTT was avoided to preserve HAT activities in the samples.

Western blot analyses. Protein concentration was measured using the RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). Western blots were performed as described previously (Rouaux *et al*, 2007), with polyclonal antibodies against CBP (06-297), p300 (05-257), acetyl-histone H2B (07-373), acetyl-histone H3 (06-599) (Upstate Biotechnology, New York, NY, USA), histone H3 (39163) (Active Motif, Carlsbad, CA, USA),

histone H2B (ab18977) (Abcam, Cambridge, UK), and PCAF (3378) (Cell Signaling). The secondary antibody used was a horseradish peroxidase-conjugated whole-goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Blots were revealed with ECL and exposed with Amersham hyperfilm ECL (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Results were quantified using the ImageJ software.

HAT Activity

HAT activity was measured on nuclear protein extracts with a colorimetric assay kit from Biovision (Clinisciences). A standard curve was performed with HeLa nuclear extracts. All samples were tested in duplicates. The activity was analyzed in a microplate reader at absorbance $A = 440$ nm. HAT activity is expressed in nmol/min/ μ g sample according to $A = \varepsilon LC$, with $\varepsilon = 37\,000$ M/cm and $L = 0.5$ cm.

CBP Immunohistochemistry

A new group of rats was trained as described above (3 days in the MWM, VPf, and HPf conditions). Animals were deeply anesthetized after the probe trial with an intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg) and perfused transcardially with 150 ml of ice-cold paraformaldehyde (4% in 0.1 M PB, 4°C). Brains were rapidly removed from the skull and post-fixed for 2 h in the same fixative at +4°C. Brains were immersed in a PBS solution and kept at +4°C until vibratome sectioning. Coronal hemisections, 40 μ m in thickness, were made through the dorsal hippocampus (from -2.30 to -4.16 mm from Bregma, according to Paxinos and Watson, 1998) using the vibratome (Leica VT1000M), and the floating sections were kept at -20°C in a cryoprotectant before use. After permeabilization (PBS1X/Triton 2%, 15 min), unspecific labeling was blocked (PBS1X/Triton 0.1%/horse serum 5%, 30 min, 37°C) and slices were incubated overnight with polyclonal anti-CBP antibody (sc-369; Santa Cruz Biotechnology), washed, and further incubated with anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated (1/500) antibody (sc2004; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h. After three washes with PBS1X/Triton 0.1%, the revelation was carried out with diaminobenzidine (DAB 0.05%, Tris 0.04 M, pH 7.5, H₂O₂ 0.03%) and mounted with Roti Histokit II (Roth, Karlsruhe, Germany). OD and area measurements were performed as described in Supplementary Materials and methods.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin Preparation. After decapitation, freshly dissected tissues were chopped with a razor blade and rapidly put in 5 ml PBS containing 1% formaldehyde for 15 min at room temperature. The fixation step was stopped by the addition of glycine (0.125 M final concentration). Samples were prepared as described in Panteleva *et al* (2007), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until needed.

Immunoprecipitation. An equal amount (100 μ g) of DNA/protein complex was assayed and brought to a volume of 500 μ l with chromatin immunoprecipitation (ChIP) dilution

buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-Cl, pH 8.1, 167 mM NaCl). A fraction of supernatants (20 μ l) from each sample were saved before IP and served as 'total input chromatin'. The remaining supernatant was incubated overnight at 4°C with 3–5 μ g of primary antibodies (acetylated-H3 (06-599; Upstate Biotechnology); acetylated-H2B, (ab1759; Abcam); CBP (A-22) sc-369/CBP (C-1) sc-7300 (Santa Cruz Biotechnology), negative control IgG antibody (Active Motif), or no antibody. This was followed by incubation with salmon sperm DNA/protein A agarose (Upstate Biotechnology) for 2 h. One microgram of rabbit anti-mouse IgG (Euromedex) was added for 30 min before the salmon sperm DNA/protein A agarose beads when a monoclonal antibody was used. After several wash steps (low salt, high salt, LiCl, and TE buffers), complexes were eluted in 250 μ l of buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃). The crosslinking was reversed (overnight at 65°C) and the DNA was subsequently purified with RNase (45 min, 37°C), proteinase K (2 h, 45°C), phenol/chloroform extraction, and ethanol precipitation. After a last wash with 70% ethanol, pellets were resuspended in 50 μ l of nuclease-free milliQ water.

PCR amplification. Semiquantitative PCR amplifications were performed with a PCR/Express from Hybaid (94°C for 2 min, and 94°C for 30 s; 60°C for 30 s; and 72°C for 30 s for 30–32 cycles). The different primers for promoter PCR amplification are described in Supplementary Materials and methods.

Statistical Analysis (Biochemical Studies)

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test (PRISM version 4.0b; GraphPad, San Diego, CA, USA). Data are expressed as the mean \pm SEM. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Determining the Time Frame in which an Efficient Spatial Memory is being Formed During Acquisition

The aim of this study was to characterize acetylation-related events (histone acetylation and HAT expression profiles) associated with spatial memory consolidation. To this end, we used a standard reference memory task in the MWM, in which rats are trained during a 5-day acquisition time course. The rats from the learning group had to search for an escape platform that was hidden at a fixed location underneath the water surface (HPf). As memory forms over several training periods, we first needed to identify a time point at which most of the signaling corresponds to consolidation-related events. This can be defined by the time at which the memory is efficient enough so that there is a marked improvement in performance over trials, but before the memory trace is formed and reliably efficient. Behavioral data are presented in Supplementary Figure S1 (A, training; B, probe trial; and C, typical swim tracks). In this spatial learning group (HPf), there was a marked improvement between days 1 and 2 (3-day group: $p < 0.01$; 5-day group: $p < 0.001$) and an almost maximal performance level was reached on day 3 (Supplementary Figure S1A). The two-way ANOVA (platform visibility \times day)

showed a significant interaction between both factors in the 3-day group ($F_{(2,16)} = 7.02$, $p < 0.01$) and a tendency toward an interaction in the 5-day group ($F_{(4,32)} = 2.14$, $p = 0.098$). That there was no further improvement in performance between days 3 and 5 confirmed that a reliable memory trace was established already during/after the third training day. A probe trial was given 1 h after the last training trial (either VPf or HPf) of day 3 to measure rat performances in the MWM. Analysis of the probe trial performance after 1 day of training indicated that the memory trace was not established yet, as rats performed by chance (ie, time in target quadrant vs 15 s: $t_{(4)} = 0.7$, NS). Interestingly, in the 3-day training group, probe trial performance was significantly above chance ($t_{(4)} = 3.0$, $p < 0.05$), as was also the case in the 5-day group ($t_{(4)} = 8.0$, $p < 0.01$), in which the time spent in the target quadrant was also longer than in the 3-day group. Thus, we determined that in our specific experimental conditions (room, pool, spatial cues, training schedule, etc), the critical time frame for efficient memory consolidation is likely to occur during day 3. Therefore, we conducted our investigations at the end of a training period of 3 days. The rats were euthanized 1 h after the last training trial in order to allow signal transduction and transcriptional regulations to take place, but less than 45 s after a probe trial, thereby minimizing the molecular impact of the latter. Thus, at this time point, we can conceive that the corresponding transcriptional events are related to molecular events occurring on day 3 both in terms of memory function and cumulative and ongoing changes in consolidation that extended over the 3 days of training. The probe trial was given to check for the presence of an efficient memory trace.

To compare the net expression levels measured during the consolidation of the memory trace, we formed a control group of rats trained under similar experimental conditions, except that they did not have to learn a particular location as they swam to a VPf. This controls for any molecular modification occurring during the water maze task, which is relevant to the context processing (navigation, stress, swimming, etc), but not to spatial learning. Expression levels measured in the HPf group relative to the VPf group should thus give a net change relevant to spatial learning.

For all subsequent experiments focusing on acetylation-dependent regulations, we trained three different groups of rats using the same 3-day protocol. Results of acquisition and retention measured for the first group ($n = 15$ per group for histone extractions and RNA/protein experiments) are representative of subsequent trainings and are shown in Figure 1a. Specific results obtained for the two other groups are shown in Supplementary Figure S1D ($n = 8$ per group for nuclear extractions and ChIP experiments) and Supplementary Figure S1E ($n = 5$ per group for immunohistochemistry experiments). With the VPf (open circles), distance to reach the platform was significantly shorter than that with the hidden one (HPf, black circles) on day 1 ($p < 0.001$). In the HPf condition, there was a significant improvement of performance over days ($p < 0.001$). Probe trials showed that the HPf rat group performed significantly above chance in the target quadrant, but not differently from or even below chance in the other quadrants (time in target vs 15 s: $t_{(15)} = 7.3$, $p < 0.001$).

Spatial Learning Induces Differential Histone Acetylation in the Hippocampus

Acetylation levels on different lysine residues of the four core histones were measured in our experimental conditions, using histone protein extracts obtained from the dorsal hippocampus (Figure 1b) and the cerebellum (control structure unrelated to spatial memorization; Supplementary Figure S2). At this global level, we detected a significant increase of acetylation levels for H2B histone (tetra-acetylated-H2BK5K12K15K20; 1.35-fold, $p < 0.01$) and H4 (H4K12; 1.38-fold, $p < 0.05$), but not for H3 (H3K9K14), or for H2A (H2AK9) histones, in HPf rats compared with VPf rats (Figure 1b). The same results were obtained when testing acetylated-H2BK12, which was activated upon learning at about the same range, whereas H3K14 and H4K5 acetylation levels remained equivalent to those found in the control group (data not shown). No significant changes between the two groups were noted in the cerebellum (Supplementary Figure S2). It is worth noting that, at this global level, acetylation induction remained very mild in the dorsal hippocampus of the learning group. Observation of acetylated-H2B histone with the neuronal marker MAP2 co-immunolabelings revealed that acetylated-H2B was present in a larger cell population than only hippocampal neurons (Supplementary Figure S3A), suggesting that the specific signal from neurons might have been underestimated when tested by western blot analyses.

Hence, from this experiment, we can clearly confirm that H2B and H4 acetylation levels are increased during memory formation. Acetylation of other histones, particularly acetylation of H3, is not changed upon learning. As the test conditions, especially when involving fear, anxiety, navigation, and/or physical exercise (swimming), could have dramatic repercussion on transcriptional events as well, we then undertook to compare H3- and H2B-acetylated levels in the dorsal hippocampus of two additional control groups that were not subjected to any spatial memorization task: a home cage (HC) control group and a group of rat tested with a VPf. The rats from the HC control group had been manipulated daily for a few minutes over 3 consecutive days before euthanasia, whereas the rats from the VPf group received 3-day training in the VPf version of the water maze (same as the control rat group used throughout this study, same experimental room). Strikingly, our results show that H3 acetylation levels were greatly enhanced in the VPf group compared with HC (Figure 1c; about twofold, $p = 0.0056$), whereas no significant changes were detected for H2B acetylation. It is therefore likely that H3 acetylation levels are already optimal for transcriptional processes to occur after 3 days in the water maze, whatever the task, ie, swimming to a VPf or learning the localization of an HPf, and this situation appeared very different from that of HC rats (see Discussion).

Histone Acetylation is Differentially Enriched on Promoters of Memory/Plasticity-Related Genes upon Formation of Spatial Memory

It was important next to establish a functional link between acetylated-histone modulations and specific gene transcription.

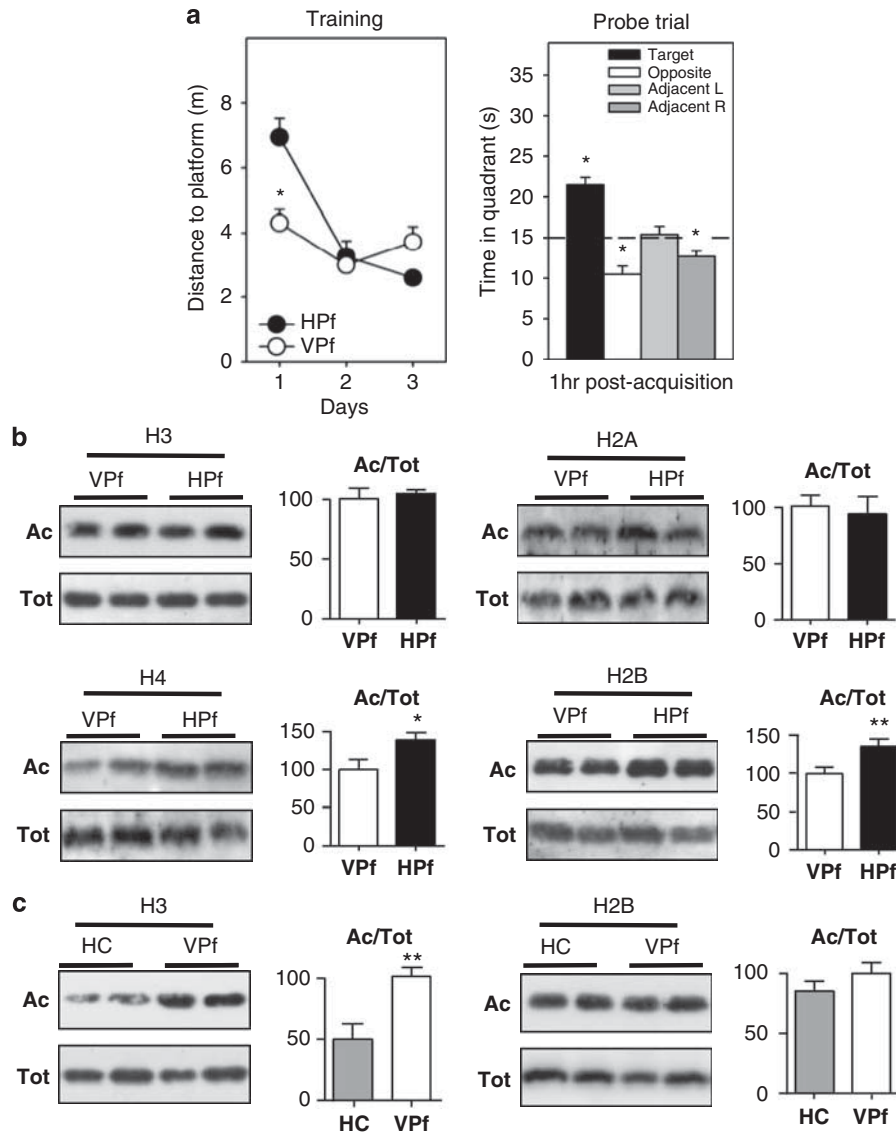


Figure 1 Specific increase of H2B/H4 acetylation levels in rat hippocampus during spatial memory formation. (a) Water maze performance in rats trained over 3 consecutive days (four trials per day) for spatial reference memory. Control rats had to swim toward a visible platform (VPf) whose location was changed from trial to trial. Learning rats had to swim to a hidden platform (HPf) at a fixed location. Left: Acquisition data are expressed as the mean (\pm SEM) distances to reach the platform. HPf rats showed a marked improvement between days 1 and 2; $*p < 0.001$. Right: Probe trial performance in the HPf rats given as the mean time in the far quadrants (\pm SEM); performance was significantly above chance level (ie, 15 s) only in the target quadrant, whereas time in the three other quadrants was either at chance level or significantly under chance. $*p < 0.05$, significantly different from chance. (b) Changes in histone acetylation levels during the formation of a spatial memory. Acetylated (Ac) and total (Tot) histone levels were measured by western blot analyses for each histone core in histone extracts obtained from the dorsal hippocampus of 3-day-trained rats (HPf vs VPf, $n = 7$ per group). Typical western blots are represented in duplicates. Quantified results are represented as fold induction of the Ac/Tot ratio for each histone, the ratio obtained in the control condition being arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test: $**p < 0.01$, $*p < 0.05$, as compared with VPf group. Significant increases in acetylation of H2B (1.35-fold) and H4 (1.38-fold) levels, but not of H3 and H2A, were measured in the rat hippocampus after 3 days of spatial learning. (c) Histone acetylation level comparison between home cage (HC) vs VPf control rats. Rats were either trained in the visible version of the water maze (VPf, $n = 6$) or left in their HC ($n = 5$)—but manipulated daily for a few minutes—over 3 consecutive days. Histone extracts were prepared and the acetylated and total histone levels are shown in duplicate for H3K9K14 and H2BK5K12K15K20. A significant increase in H3 acetylation is measured between both groups (twofold), whereas H2B acetylation ratio remains unchanged. Student's *t*-test: $**p < 0.005$, as compared with the HC group.

The expression of four genes related to synaptic plasticity and/or memory was measured by RT-qPCR in our first groups of trained rats (see behavioral data in Figure 1a). We measured the expression of *bdnf-eIV* (brain-derived neurotrophic factor, exon IV; Aid *et al*, 2007), *cFos*, and *FosB*, as well as the well-documented immediate-early gene activated

during spatial memorization: *zif268* (early growth response 1; Guzowski *et al*, 2001). They have all been shown to bear canonical CREB-binding sites (Shieh *et al*, 1998; Davis *et al*, 2000; Impey *et al*, 2004). Figure 2a shows that transcription of all of these genes was significantly increased in the HPf group compared with the control VPf group: 2.32-fold

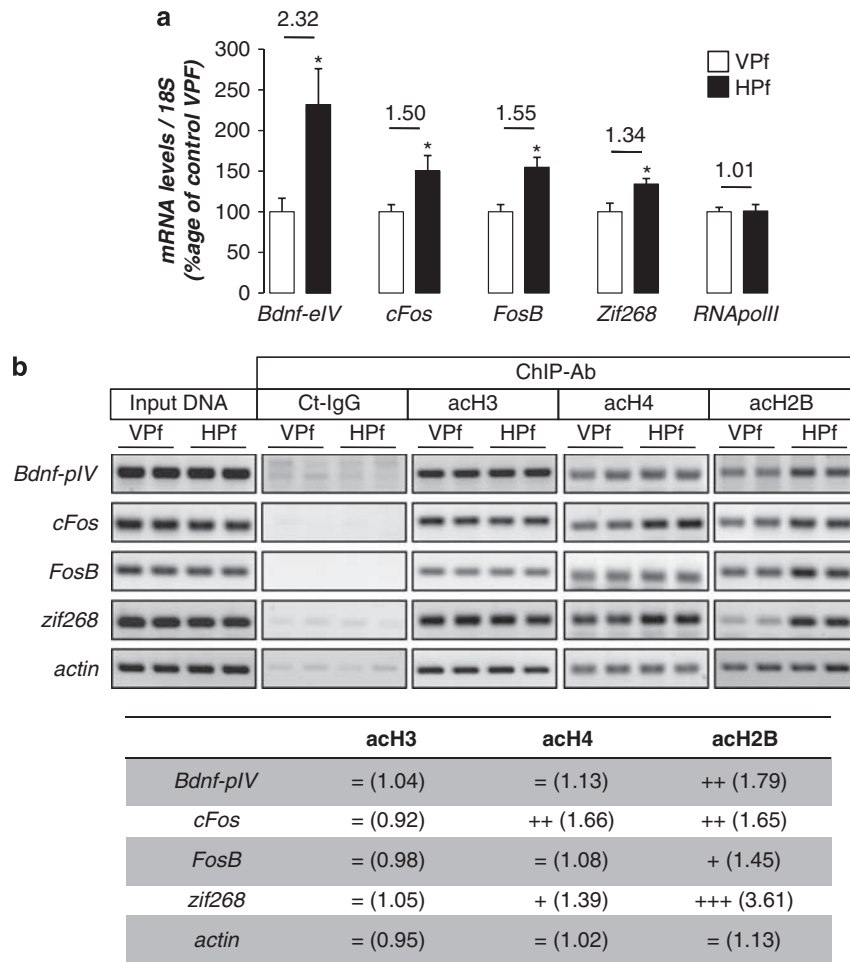


Figure 2 Several memory/plasticity-related genes present an acetylated-H2B/H4 enrichment on their promoters during the consolidation of a spatial memory. (a) mRNA expression levels of several CBP/memory-related genes: *bdnf-eIV*, *cFos*, *FosB*, and *zif268* were evaluated by RT-qPCR in the dorsal hippocampus of control (visible platform, VPf) and learning (hidden platform, HPf) groups trained for 3 days. RNA polymerase II was tested as an internal negative control. Values were normalized to the 18S ribosomal subunit. Data are expressed as mean (\pm SEM) ($n = 6$ per group), with percentage relative to the control group (VPf) arbitrarily set at 100%. Fold inductions are indicated above histograms. Student's *t*-test: * $p < 0.05$, as compared with VPf. (b) Chromatin immunoprecipitation were performed on 3-day-trained rats from the VPf and HPf groups ($n = 3$). Semiquantitative PCR were performed to analyze the presence of *bdnf-pIV*, *cFos*, *FosB*, and *zif268* proximal promoters in the immunoprecipitates. Controls for immunoprecipitation were performed with an unrelated control antibody (Ct-IgG) or no antibody (noAb). Input DNA corresponding to the total of chromatin before immunoprecipitation was run in parallel as positive control. Representative results are shown in duplicate for each gene tested. β -Actin was used as internal control. Bands were quantified (ImageJ) and fold inductions (f.i.) are indicated in the table below. An activation score was arbitrarily affected by the HPf vs VPf condition: (+ + +) when f.i. > 2.00 ; (+ +) when f.i. > 1.50 ; (+) when f.i. > 1.25 ; and (=) when $-0.25 < f.i. < +0.25$. acH3, acetylated K9, K14 H3 histone; acH4, acetylated K12 H4 histone; acH2B, acetylated K12, K15 H2B histone; *Bdnf-eIV*, *bdnf* exon IV; *bdnf-pIV*, *bdnf* promoter IV.

($p < 0.05$) for *bdnf-eIV*; 1.50-fold ($p < 0.05$) for *cFos*, 1.55-fold ($p < 0.05$) for *FosB*, and 1.34-fold ($p < 0.05$) for *zif268*. We then sought to determine the enrichment in acetylated-H3, -H4, and -H2B histones on their proximal promoter (Figure 2b). To this end, ChIP experiments were performed on dorsal hippocampi freshly dissociated from newly trained rat groups (see behavior in Supplementary Figure S1D) with antibodies directed against the modified histones or a non-related IgG control antibody. Semiquantitative PCR results are shown in duplicates and their quantification is presented in the table at the bottom of Figure 2b. An enrichment of acetylated-H2B histone was clearly detectable on the promoter of the four genes (*bdnf-pIV*: 1.79-fold; *cFos*: 1.65-fold; *FosB*: 1.45-fold; and *zif268*: 3.61-fold) in the HPf-trained rats compared with the control group (VPf). Acetylated-H2B histones are present on the actin promoter,

but levels do not change upon learning. Acetylated-H4 was found enriched on *cFos* and *zif268* only (1.66- and 1.39-fold, respectively). Acetylated-H3 histone is present on all these genes, but no difference was seen between the two groups. This is reminiscent of the fact that global levels of acetylated-H3 did not change in the learning HPf group when compared with the control VPf group. Altogether, these data show that spatial learning induces the transcription of specific memory/plasticity-related genes, in part through a differential increase of acetylated histones onto their proximal promoter. It is worth noting for the first time that acetylated-H2B is increased by learning and actually participates in this process by binding the promoter of such genes. The further characterization of other acetylated-H2B target genes is currently under investigation.

Global HAT Expression and Activity are Upregulated in the Dorsal Hippocampus during the Formation of a Spatial Memory

Gene expression was then evaluated for several HATs: p300 (KAT3B), a CBP-related protein that shares many of its functions, the GNAT family member PCAF (p300/CBP-associated factor), and the MYST family member Tip60 (KAT5). Results are shown in Figure 3a. The results of this experiment showed a 1.66-fold ($p < 0.05$) increase of *cbp* mRNA expression levels in the learning group relative to the control group. A moderate but significant increase was also observed for p300: 1.46-fold ($p < 0.01$) and PCAF: 1.34-fold ($p < 0.05$), whereas no change in Tip60 was measured. Levels of the RNA polymerase II subunit, used here as a second internal control, remained unchanged. In addition, when measured in a group of rats trained for only one day (instead of 3) in the MWM, the level of these HATs were not significantly different in the HPf group from that in the VPf group (Supplementary Figure S4A), suggesting that increased HAT expression is induced and accumulates over repeated training (ie, reference memory and not working memory).

The different HAT protein levels were measured from total protein extracts and nuclear protein extracts prepared from different animals from the secondly trained group (see behavioral data in Supplementary Figure S1D). We found that CBP protein levels significantly increased in total extracts (1.68-fold, $p < 0.05$) and nuclear protein extracts (1.86-fold, $p < 0.05$) from the dorsal hippocampus of learning compared with control rats (Figure 3b). P300 and PCAF proteins also showed a trend to, but not significant, increase in these latter extracts (1.31- and 1.21-fold respectively, Figure 3B). No change was observed between the HPf and VPf groups in the cerebellum (Supplementary Figure S4B). Interestingly, when tested in an *in vitro* assay, these nuclear extracts obtained from the dorsal hippocampus of learning rats displayed a significant increase in global HAT activity when compared with control rats (18.5%, $p < 0.01$). No change was seen between the two groups in the cerebellum (Figure 3c).

The CBP-Dependent Pathway is Specifically Upregulated in the Dorsal Hippocampus during the Formation of a Spatial Memory

As the dorsal hippocampus is a mixture of different cell populations, we also investigated CBP localization by immunohistochemistry in normal rats. As revealed by co-labeling of CBP (–FITC) with the neuronal marker MAP2 (–Cy3), we observed that CBP is expressed at higher levels in pyramidal neurons of the CA1 region (Supplementary Figure S3B), and in granular neurons of the dentate gyrus (DG) (data not shown), compared with the surrounding non-neuronal cells. This suggests that our studies are not particularly biased by the expression of CBP in non-neuronal cells.

In order to quantify CBP levels between both groups (VPf and HPf) at the subregion level of the dorsal hippocampus (CA1 vs DG), CBP immunohistochemical staining followed by DAB labeling was performed in a last rat group (see behavioral data in Supplementary Figure S1E). A typical

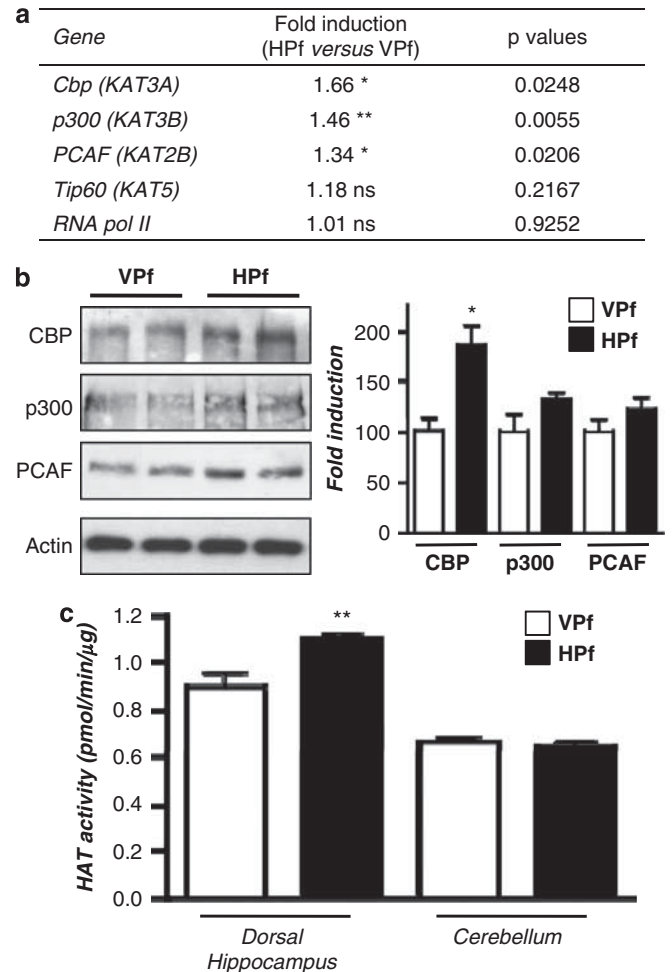


Figure 3 Increased expression level of several HATs and their activity during consolidation of a spatial memory. (a) HAT gene expression. mRNA expression levels of different genes were evaluated by RT-qPCR in the dorsal hippocampus of control (visible platform, VPf) and learning (hidden platform, HPf) groups ($n = 5$ per group). Values were normalized to the 18S ribosomal subunit and the fold inductions and p -values are presented. Student's t -test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and NS, nonsignificant. *Cbp*, *p300*, and *PCAF* mRNA levels are significantly increased in the hippocampi of learners (HPf). CBP, CREB-binding protein; p300, E1A-binding protein p300; PCAF, p300/CBP-associated factor; Tip60, HIV-1 tat interactive protein; and RNA pol II, polymerase (RNA) II. The new nomenclature of HATs as lysine(K)-acetyltransferases (KATs) is mentioned within parenthesis (Allis et al, 2007). (b) HAT protein expression. HAT levels were assessed by western blot in nuclear protein extracts obtained from the dorsal hippocampus of rats trained as in (a). Typical blots are shown in duplicates. Blots were quantified ($n = 7$ per group) and results normalized against actin are shown (right). * $p < 0.05$, as compared with VPf. CBP was increased by 1.86-fold in the dorsal hippocampus during consolidation of spatial learning. P300 and PCAF show a nonsignificant trend to increase in the same conditions. (c) HAT activity. The same nuclear protein extracts as in (b) were used. HAT activity was measured on 30 μg of dorsal hippocampus or cerebellum nuclear protein extracts from the two rat groups (VPf and HPf). HAT activity is expressed in nmol/min/μg protein according to $A = \epsilon LC$. No significant change is found in the cerebellum, whereas global HAT activity was increased in the dorsal hippocampus. ** $p < 0.01$, HPf vs VPf.

labeling is presented in Figure 4a. Densitometry counting is shown in Figure 4b. A two-way ANOVA of the ODs of CBP immunoreactivity in CA1 (left panel) and in the DG (right panel) revealed a significant effect of platform

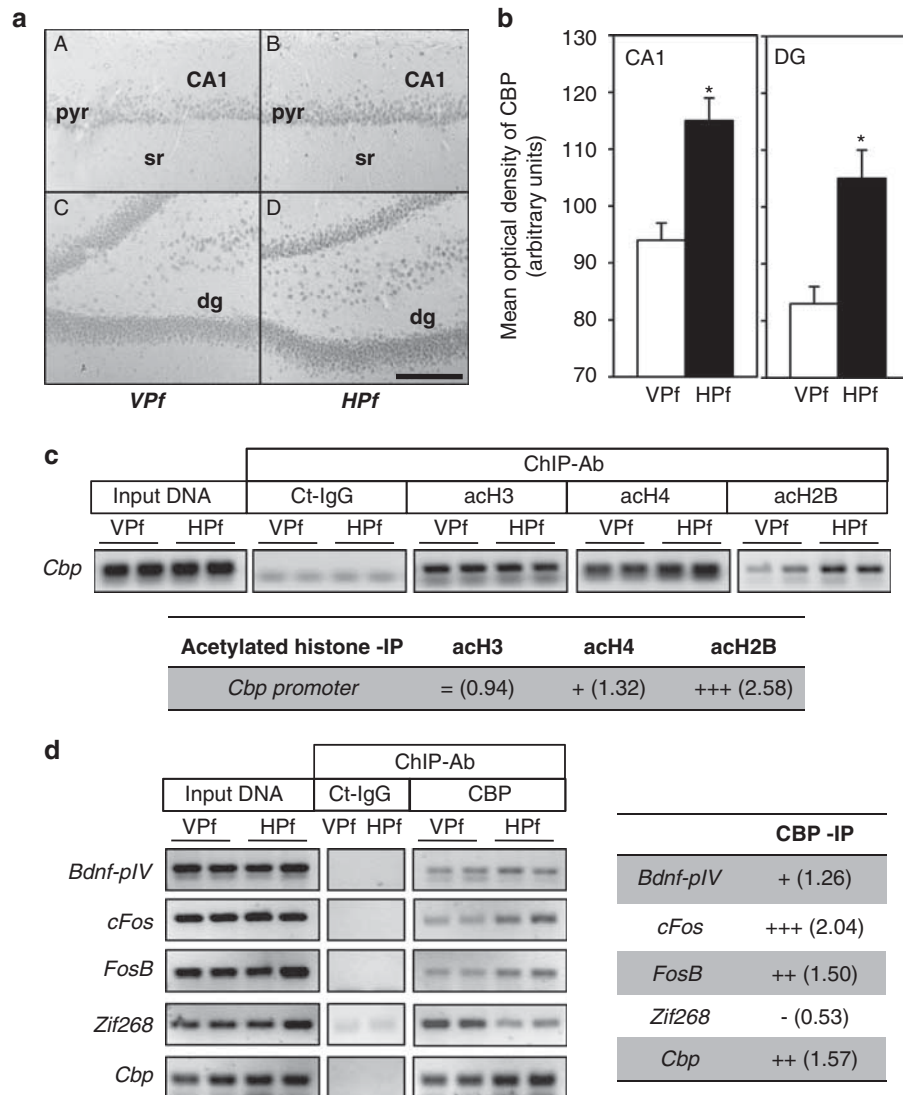


Figure 4 CBP-dependent regulations in the rat dorsal hippocampus during the formation of a spatial memory. (a) Representative images of CBP immunoreactive staining revealed with DAB staining in regions CA1 (A, B) and in the dentate gyrus (dg; C, D) of the dorsal hippocampus in representative VPf rats (A, C) and HPf (B, D) rats. Pyr: pyramidal neuron layer; sr: stratum radiatum; dg: dentate gyrus. Scale bar = 250 μ m. (b) Mean (\pm SEM) optical density of CBP immunoreactive staining in the CA1 pyramidal cell layer (CA1) and in the dentate gyrus granular layer (DG). In HPf rats ($n = 5$), whatever the region, the optical density of CBP immunoreactivity was significantly larger than in VPf rats ($n = 5$). * $p < 0.05$. (c) Chromatin immunoprecipitation of acetylated histones were performed on chromatin obtained from 3-day-trained rats from the VPf and HPf groups ($n = 3$). Semiquantitative PCR were performed to analyze the presence of *cbp* proximal promoter in the immunoprecipitates. Controls for immunoprecipitation were performed with an unrelated control antibody (Ct-IgG) or no antibody (noAb, not shown). Representative results are shown in duplicate for each gene tested. Bands were quantified (ImageJ) and fold inductions (f.i.) are indicated in the table below. acH3: acetylated K9, K14 H3 histone; acH4: acetylated K12 H4 histone; and acH2B: acetylated K12, K15 H2B histone. (d) Chromatin immunoprecipitation of CBP were performed on chromatin obtained from 3-day-trained rats from the VPf and HPf groups ($n = 3$). Semiquantitative PCR were performed to analyze the presence of *bdnf-pIV*, *cFos*, *FosB*, *zif268*, and *cbp* proximal promoters in the immunoprecipitates. Controls for immunoprecipitation were performed with an unrelated control antibody (Ct-IgG, shown in simplicate) or no antibody (noAb, not shown). Representative results are shown in duplicate for each gene tested. Bands were quantified (ImageJ) and fold inductions (f.i.) are indicated in the table on the right. *Bdnf-pIV*: *bdnf* exon IV; *bdnf-pIV*: *bdnf* promoter IV. (c, d) Input DNA corresponding to the total of chromatin before immunoprecipitation was run in parallel as positive control. An activation score was arbitrarily affected by the HPf vs VPf condition: (+ + +) when f.i. > 2.00; (+ +) when f.i. > 1.50; (+) when f.i. > 1.25; (=) when 1.25 < f.i. > 0.75; and (-) when f.i. < 0.75.

visibility ($F_{(1,9)} = 17.6$, $p < 0.01$) and an overall effect of the region ($F_{(1,9)} = 91.1$, $p < 0.001$) that was due to stronger ODs in CA1 as compared with the DG; the interaction between both factors was not significant ($F_{(1,9)} < 1.0$, NS). Multiple comparisons showed that the ODs were significantly larger in learners (HPf) vs controls (VPf) in

each region ($p < 0.01$). In a control structure, the auditory cortex, we found similar CBP levels in both groups (HPf = 100.4 ± 6.6 vs VPf = 100.5 ± 5.2 ; $F_{(1,9)} < 1$, NS), confirming the region-specific enhancement of CBP immunoreactivity in the dorsal hippocampus during learning.

If *cbp* transcription was significantly enhanced in the hippocampus of learning rats, there should be changes at the chromatin level of its promoter. We tested this using ChIP experiments with the different acetylated histones on the *cbp* promoter. Primers were designed spanning 110 bp of the proximal region of the rat *cbp* promoter sequence (see Materials and methods) and we found a strong enrichment of acetylated-H2B in this region in HPf vs VPf groups (Figure 4c). In addition, there was a moderate enrichment of H4 in HPf as compared with VPf rats, as for the other target genes tested, and no enrichment of H3; yet, the binding was already strongly detected in the VPf control situation (Figure 4c). These results are in line with our previous data showing differential acetylation of histones in response to learning (Figure 1b) at specific genes (Figure 2b) and further outline that the *cbp* promoter is favorable to transcriptional upregulation of the *cbp* gene at that time of memory formation. Finally, we expected to be able to immunoprecipitate the different HATs, but could get reliable results only for CBP (Figure 4d). We found a differential CBP occupancy on the different genes. Surprisingly, *bdnf-pIV*, one of the most activated genes in the HPf conditions (see qPCR results in Figure 2a) displayed a very moderate enrichment of CBP occupancy upon learning. A possibility is that CBP could also be present on the *bdnf* promoter IV of rats swimming to the VPf and that another HAT (such as p300 or PCAF) has increased histone acetylation on the *bdnf* promoter IV in relation to the memory of the platform location (see Discussion). Again, the result obtained for *zif268* is very surprising as CBP occupancy is clearly decreased in the learning group, whereas this same promoter region displayed a strong acetylated-H2B enrichment (see Figure 2b). By contrast, CBP occupancy is increased in both *cFos* and *FosB* gene promoters. These interesting results emphasize a model in which several HATs are in play for modulation of specific memory/plasticity-related genes. This interplay between the different HATs that control such gene expression needs further investigation.

Overall, these experiments point to a functional increased expression of several HATs that can regulate specific gene transcription via H2B and H4 acetylation during an ongoing process of spatial memory formation and suggest that these newly formed HAT molecules could contribute to the consolidation of the trace by inducing new genetic programs.

The CBP/Acetylation Pathway is Downregulated after Hippocampal Denervation Inducing Spatial Memory Deficits

If our data obtained on the CBP/histone acetylation-dependent signaling pathway are relevant to memory formation and consolidation, one should expect to find them altered in an animal model in which consolidation is impaired. Traissard *et al* (2007) recently reported on a rat model that is completely unable to learn a reference memory task in the MWM (Traissard *et al*, 2007). These rats are double-lesioned on brain regions that typically degenerate during the early course of AD, a neurodegenerative disease characterized, at the cognitive level, by progressive memory disruption ending up in dementia.

Of note, spatial memorization processes are also particularly affected in this disease. Lesioned regions in the rat model include the cholinergic component of the BF and the connections between the EC. Verification of the lesions in lesion or sham-operated rats are presented in Figure 5a and behavioral scores (training and probe trial) are shown in Figure 5b.

At the anatomical level, intraseptal injections of 192 IgG-saporin induced a massive decrease of AChE activity in the posterior hippocampus (Figure 5a, A and B), as well as of the number of ChAT-positive neurons in the medial septum (Figure 5a, C and D) and, although to a much lesser extent, in nucleus basalis magnocellularis (Figure 5a, E and F). We also performed semiquantitative assessment of the OD of AChE staining in several brain structures and found a specific and significant decrease (−47%) in the ODs in the posterior hippocampus (Supplementary Figure S5A). Likewise, the number of ChAT-positive neurons was significantly decreased in the BF (−85 and −83% in the medial septum and the diagonal band of Broca, respectively, and −31% in the nucleus basalis magnocellularis), whereas Parv-immunopositive neurons (and thus GABAergic) were only significantly decreased (−48%) in the diagonal band of Broca (see Supplementary Figure S5A). The lesion extent within the medial and lateral EC, as well as in surrounding regions, was evidenced on sections from the posterior region of the cortex that were immunostained for NeuN (Figure 5a, G and H). Basically, the EC lesions were very similar in location and extent to those reported by Traissard *et al* (2007); both the hippocampus and the septal region showed evidence for extensive cholinergic damage.

At the behavioral level, the capacity of sham-operated vs lesioned rats to swim to a VPf was evaluated on the first day. The average performance over four consecutive trials did not differ significantly between the two groups, although a tendency to higher distance to reach the platform was evidenced in the lesion group as compared with sham-operated rats (Supplementary Figure S5B, $p = 0.06$). Both groups, however, showed a trial-dependent decrease in the distance to platform as expected, although in the lesion group the distance was moderately but significantly increased ($p < 0.005$) on the fourth trial as compared with sham (Supplementary Figure S5B). These data showed that lesion rats presented no major deficit in navigation, motivation, and/or sensorimotor aspects in an MWM, which could impact performance in the HPf condition. Rats were then trained for 3 days in reference memory. Analysis of the training scores showed no significant group effect ($F_{(1,19)} = 0.03$) or a significant day effect ($F_{(2,38)} = 13.6$, $p < 0.001$), and there was a strong tendency toward a significant interaction between both factors ($F_{(2,38)} = 2.9$, $p = 0.06$). There was an overall improvement (both groups collapsed) owing to performances that were better on days 2 and 3 as compared with day 1 ($p < 0.001$ for each comparison). However, rats bearing the combination of both lesions did not remember the platform location in the probe trial performed after an 1-h delay, whereas sham rats still remembered it (Figure 5b, below). During this trial, their time in the target quadrant was significantly above chance (ie, 15 s; $t_{(10)} = 4.7$, $p < 0.001$), conversely to the time recorded in the lesion rats; in fact, the latter did not differ significantly from chance level ($t_{(9)} = 1.7$, NS). Furthermore,

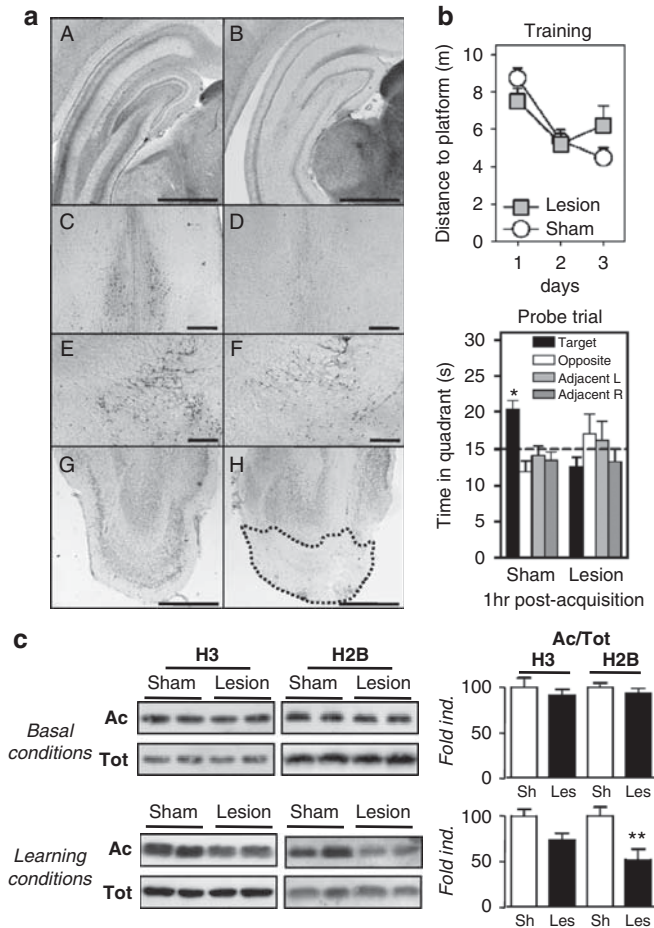


Figure 5 Histone acetylation levels in a cognitively impaired rat model. (a) Histological verification of the location and extent of cholinergic and entorhinal cortex (EC) lesions. A, C, E, and G are representative pictures of one sham-operated rat; B, D, F, and H are representative pictures of one rat subjected to the double lesions. A, B are typical examples of AChE-positive staining in the posterior hippocampus as observed at about -5.5 mm from Bregma (notice the marked decrease of dark staining accounting for cholinergic denervation in B); C, D are typical examples of ChAT-positive immunostaining in the medial septum at about $+0.2$ mm from Bregma (notice the dramatic reduction in D); E, F are examples of ChAT-positive immunostaining in the nucleus basalis magnocellularis and the substantia innominata (notice that the decrease is much less pronounced than in the septal region in F). G, H are examples of NeuN-positive staining in the posterior region of the cortex (coronal sections) illustrating the lesion extent in the medial and lateral entorhinal cortex at about Bregma 7.6 mm (notice the almost total loss of neuronal staining within the area delimited by the stippled line in H). All coordinates indicated in this caption are according to Paxinos and Watson (1998). Scale bar = $1000 \mu\text{m}$ in A, B, G, and H, and scale bar = $500 \mu\text{m}$ in C, D, E, and F. (b) Effects of double lesions on water maze performance. Upper panel: Acquisition data during the 3-day-training period are expressed as the mean (\pm SEM) of the distances to reach the platform in rats subjected to a lesion of septal cholinergic neurons and a fiber-sparing lesion of neurons in the EC (lesion, $n = 10$) as compared with performance in the sham-operated controls (sham, $n = 11$). Lower panel: Probe trial performance indicated as the mean time in the far quadrants (\pm SEM). Sham-operated control rats showed a performance in the target quadrant that was significantly above chance (ie, 15 s). In contrast, the double lesion affected spatial memory functions, as the lesioned rats did not focus their search in the appropriate quadrant. * $p < 0.05$, significantly above chance. (c) Acetylated (Ac) and total (Tot) histone levels were measured by western blot analyses for H3 and H2B histones in total extracts obtained from the dorsal hippocampus of home cage rats (basal conditions; sham, $n = 6$; lesion, $n = 8$) or of trained rats (learning conditions: HPF group during 3 days for all rat groups; sham, $n = 7$; lesion, $n = 7$). Lysine acetylations measured are H3K9K14 and H2BK5K12K15K20. Typical western blots are represented in duplicates. Quantified results are represented as fold induction of the Ac/Tot ratio for each histone. The ratio obtained in the control condition is arbitrarily set at 100%. Sh, sham; Les, lesion. Student's t -test: ** $p < 0.01$. A significant decrease in acetylation of H2B is observed in the hippocampus of trained rats, but not in that of home cage rats. Acetylated-H3 levels tend to decrease as well only in learning conditions.

the scores of sham rats were significantly above those found in lesion rats ($F_{(1,19)} = 19.6$, $p < 0.001$). Typical swim tracks observed in the probe trial after the 3-day training session are presented in Supplementary Figure S5C. These analyses clearly show that while lesion rats seemed to improve performance during the training phase, there was no evidence for memory consolidation.

The functional response of the CBP/histone acetylation pathway was then evaluated in such a pathological rat lesion model. We first verified the levels of histone acetylation in basal conditions (ie, HC) in the sham-operated rats vs the lesioned ones. Figure 5c (upper panel) shows that, in the dorsal hippocampus, there were no significant modifications at the global level on the ratio of acetylated/total histone acetylation for H3 or H2B. Similar results were obtained in the cerebellum extracts from the same rats (Supplementary Figure S6, upper panel). These data suggest that the combination of the two lesions did not impact on basal hippocampal (or cerebellar) functions regulated by these specific histone acetylation modifications. Second, we investigated these regulations in sham and lesion rats that had been subjected to the learning task. We found that acetylated-H2B histone levels remained significantly lower by almost 50% ($p < 0.01$) in the lesion group compared with the sham group (Figure 5c, lower panel). This clearly shows that the dynamic regulation of H2B acetylation cannot occur normally in the denervated hippocampus. It is worth

noting that acetylated levels of H3 histone, even if not statistically significant, also tended to decrease in the lesion compared with sham rats (26%, NS; Figure 5c). These data suggest that BF cholinergic and EC glutamatergic projections to the hippocampus interfered with the acetylated histone regulation induced by the MWM tasks (context processing and learning of the task). Importantly, such alterations in H2B and H3 acetylation levels found in the rat dorsal hippocampus were not observed in control cerebellar tissue of the rats that had learnt the task (Supplementary Figure S6, lower panel), evidencing a lack of histone acetylation regulation specifically in the denervated hippocampus. We can thus conclude that histone acetylation regulation necessary for memory functions (at least for H2B and H3) in the hippocampus is under the dynamic control of at least one of both BF cholinergic and EC glutamatergic projections.

Subsequently, CBP levels, target gene expression, and acetylated-H3/H2B histone enrichment on their promoter were verified after training in the MWM (Figure 6). In the lesion group, CBP was neither upregulated at the mRNA level (CBP levels are 37% lower in lesion compared with sham group, $p < 0.05$; Figure 6a) nor at the protein level

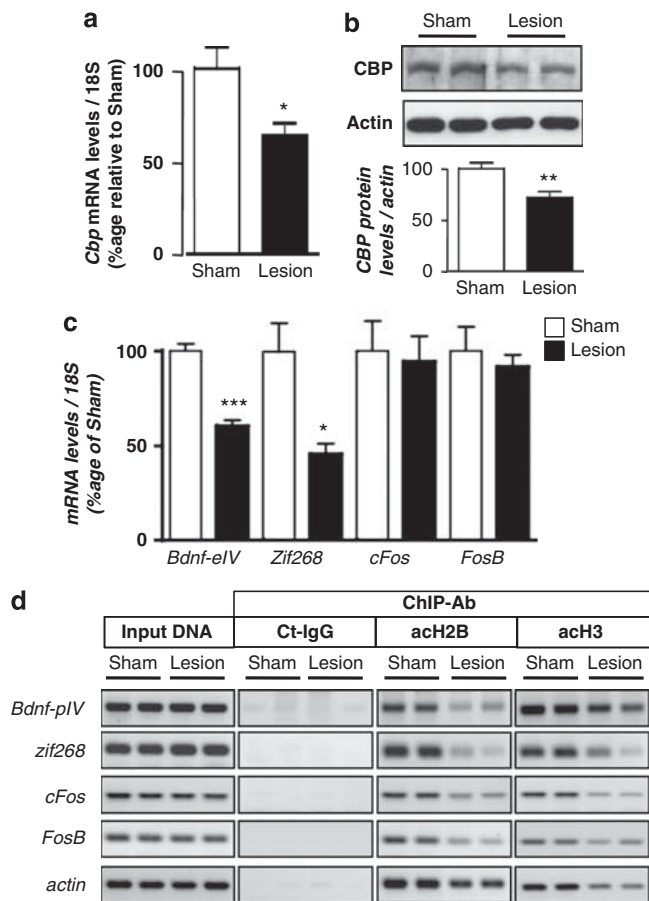


Figure 6 CBP- and histone acetylation-dependent regulations during formation of a spatial memory in a cognitively impaired rat model. *Cbp* transcripts (a) were evaluated by real-time RT-PCR ($n=5$) and CBP protein (b) by western blot analyses ($n=7$) in the dorsal hippocampus from sham-operated (sham) or double lesion (lesion) rats group after a 3-day-training period. CBP levels were not increased by the spatial memory training in lesion rats, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, as compared with sham. (c) Real-time RT-PCR analysis of *bdnf-eIV*, *zif268*, *cFos*, and *FosB* genes in the same conditions as in (a), $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, as compared with sham ($n=5$). (d) Chromatin immunoprecipitation were performed on 3-day-trained rats from sham and lesion groups in the HPf version of the water maze ($n=3$ per group). Semiquantitative PCR were performed to analyze the presence of *bdnf-pIV*, *cFos*, *FosB*, and *zif268* proximal promoters in the immunoprecipitates. Controls for immunoprecipitation were performed with an unrelated control antibody (Ct-IgG) or no antibody (noAb). Input DNA corresponding to the total of chromatin before immunoprecipitation was run in parallel as positive control. Representative results are shown in duplicate for each gene tested. β -Actin was used as internal control. acH3: acetylated K9, K14 H3 histone; acH2B: acetylated K12, K15 H2B histone; *bdnf-eIV*: *bdnf* exon IV; and *bdnf-pIV*: *bdnf* promoter IV. After 3 days of spatial training, none of the promoters are enriched in acetylated-H2B or in acetylated-H3 histones in the lesion rat group as compared with sham-operated rats.

(29% lower in lesion compared with sham group, $p < 0.01$; Figure 6b) upon spatial learning, relative to the sham group. *Bdnf-eIV* and *zif268* mRNA levels were not induced in the lesion group in response to spatial training (respectively, 40% lower than in the sham rats, $p < 0.001$ and 54%, $p < 0.05$; Figure 6c). This was further supported by ChIP experiments (Figure 6d) showing that acetylated-H2B histone levels were dramatically reduced on their promoters (*bdnf-pIV*: 66% and *zif268*: 64%). These data indicate that,

in this lesion model, signaling in the dorsal hippocampus is not sufficient to achieve the gene regulation necessary for memorization. This is consistent with our previous findings and further supports the importance of the CBP/acetylation signaling pathway for memory consolidation. In addition, acetylated-H3 histone enrichment was also decreased on these genes, suggesting that the denervated hippocampus could not integrate context processing-dependent acetylation either. Intriguingly, acetylated histone occupancy was reduced on actin, *cFos*, and *FosB*, whereas their expression levels were not significantly altered (Figure 6b and c). A possible explanation could be that in such situation, the transcription of these genes is less dependent on histone acetylation. β -Actin may also be more stable. The molecular mechanisms by which this happens remain unclear, but it is worth noting that if they could compensate for actin, *cFos*, and *FosB* regulations, they could not compensate for the specific regulations on *bdnf-eIV* and *zif268* engaged during memory formation.

Downregulation of the CBP/histone acetylation-dependent pathway is observed in a rat model in which consolidation of a spatial memory is compromised. This probably underlies the lack of proper transcriptional regulation of specific memory genes, as we show for the *bdnf* and *zif268* genes. We hypothesize that a specific genetic program necessary for or underlying memory consolidation is not recruited because a certain HAT/acetylation threshold has not been achieved in the lesion rat (see model in Figure 7). In addition, these data point to the importance of the EC glutamatergic and BF cholinergic projections role in controlling CBP/histone acetylation-dependent regulations in the context of (spatial) memory formation.

DISCUSSION

These experiments reveal three fundamental points in memory formation and consolidation that suggest promising therapeutic strategies. First, there is a differential regulation of the histone acetylation profile in the hippocampus of normal rats while a trace memory is being established. We report for the first time an increase in acetylation of the H2B histone during spatial learning, which can be functionally related to activated memory/plasticity gene transcription. Conversely, H3 acetylation appeared reactive to the environmental context rather than to the spatial learning task itself. This means that H2B acetylation could represent an epigenetic marker of LTM for spatial information. Second, we found that several HATs were upregulated at the transcriptional levels in the dorsal hippocampus during the ongoing process of memory formation. Notably, CBP protein levels were increased after repeated trainings, suggesting a potential role in controlling the length and intensity of specific genetic programs during memory consolidation. Third, we found that the CBP/histone acetylation pathway had lost its responsiveness to training in a rat model that mimics some of the lesions described in AD, thus accounting for impaired memory function and consolidation processes in particular. Currently, there is a great deal of research on therapeutic strategies for memory enhancers based on acetylation

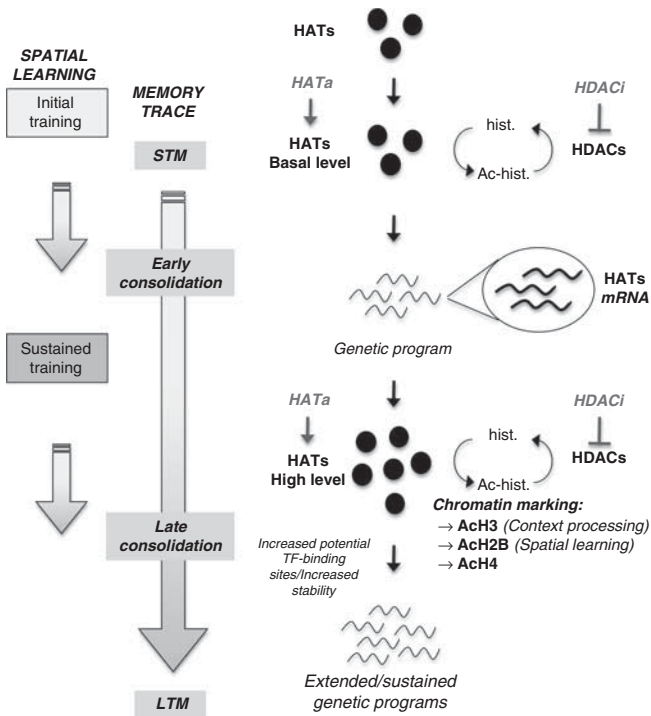


Figure 7 Hypothetical model of molecular interplay underlying consolidation of spatial memory. During the initial steps of a training aimed at acquiring a spatial task, the memory trace is progressively setup following a cascade of intracellular signals involved in short-term memory (STM) processing. These processes are non-transcriptional events (Kandel, 2001; Medina *et al*, 2008) as existing co-activators (HATs, basal levels) and transcription factors present in neurons are likely in sufficient quantities to promote a genetic program necessary for early consolidation signals. Here we show that, while training is pursued, the expression of several HATs (CBP, p300, and p300/CBP-associated factor (PCAF)) is increased, thus generating new HAT molecules (HATs, high level)—and CBP in particular—during a critical time window of spatial memory formation. We propose that reaching a new HAT threshold could allow a widening of HAT-binding partners to a larger panel of transcription factors and/or increase HAT stability over time, thereby potentially triggering extended and/or sustained specific genetic programs for late consolidation. We showed that repetition of training ('sustained training') is associated with increased HAT activity and new chromatin marking: histone H3 is acetylated in response to context-related processing (visible platform), whereas H2B histone is acetylated during spatial learning (hidden platform). H4 histone acetylation is also increased during the late consolidation phase. Each acetylation step can be reversed under the action of histone deacetylase (HDAC) enzymes, probably underlying the memory enhancer effect of some HDAC inhibitors (HDACi) (for reviews see, Barrett and Wood, 2008). Taken together, our results suggest that an epigenetic tagging of the genome takes place under the influence of HAT expression at specific memory/plasticity genes throughout the formation of spatial long-term memory (LTM). They also emphasize that directly promoting this chromatin marking pattern with HAT activators could be a new therapeutic strategy for memory enhancers, potentially more specific than HDAC inhibition. Ac, acetylated; hist., histone; HATa, HAT activator; TF, transcription factor.

modulators, notably with the use of HDACi. These findings could have interesting therapeutic repercussions for treating neurodegenerative disorders such as AD and other memory-related disorders, as they bring compelling evidence predicting that agents able to increase HAT/CBP expression will be more specific than HDACi.

A Potential Link between H2B Acetylation and Memory Formation?

Specific epigenetic tagging of the genome in relation to LTM is an intriguing hypothesis (Wood *et al*, 2006b; Sweatt, 2009) and different works have focused on histone post-translational modifications, mainly acetylations, during task acquisition (reviewed by Barrett and Wood (2008)). Recent studies have also evidenced changes in histone methylation, at a site marking gene activation, during contextual fear memory (Gupta *et al*, 2010). We show that, while no change in acetylation levels was detected on H3 and H2A histones, the acetylated forms of H2B and H4 histones were significantly increased in the dorsal hippocampus of rats during spatial memory formation. H3 acetylations were upregulated after 3 days of training in the MWM (HPf and VPf) as compared with untrained controls. This upregulation could be a consequence of adaptations to the testing situation, rats having to cope with stress, fear, swimming, and other basic navigation-related processes in both task versions. Accordingly, H3 acetylation might have epigenetically tagged the genome in order to promote transcription of specific genes recruited by such adaptive processes, or to prepare the chromatin for the subsequent gene transcription required in memorization processes (ie, bring a first degree of chromatin opening). Nevertheless, in the same experimental conditions, H2B acetylation levels remained unchanged (Figure 1c), supporting that the increase observed between learning and control rats (Figure 1b) was highly relevant to the acquisition of a spatial memory.

This is the first work describing H2B acetylation modulation in mammals during a physiological process. Indeed, so far, functional studies on acetylation of H2B have been mostly limited to yeast (reviewed by Wyrick and Parra (2009)). Early biochemical experiments showed that acetylation of the histone H2A–H2B dimer facilitated transcription *in vitro* (Puerta *et al*, 1995). H2B bears a conserved repression (HBR) domain for specific gene transcription and acetylation of the N-terminal lysines of H2B can partially overcome this repression (Parra *et al*, 2006). Our prime interest is now to identify acetylated-H2B target genes and their relevance to spatial memory consolidation in hippocampal neurons. Interestingly, a downregulation of only H2B histone acetylation was found in the hippocampus of *cbp +/–* mice (Alarcon *et al*, 2004), and H2B was also identified as a substrate for p300 and PCAF, but not Tip60 (Roth *et al*, 2001; Allis *et al*, 2007). At the mechanistic level, a recent paper described the acetylation of H2B in response to depolarization in hippocampal slices *in vitro* (Maharana *et al*, 2010). This is in line with our study enlightening the implication of glutamatergic—at least in part with cholinergic—projections in the control of H2B acetylation and further strengthened its potential role in memory formation. We show that acetylated-H2B are enriched at selected gene promoters related to (spatial) memory function (Figure 2B), as well as to the *cbp* gene itself (Figure 4c). Recently, the HDAC2 isoform was shown to regulate memory formation and synaptic plasticity through deacetylation at some of these gene promoters (Guan *et al*, 2009). Interestingly, among the four core histones, H2B and H4, but not H3 and H2A, were hyperacetylated in hippocampal

histone extracts from HDAC2 knockout mice (Guan *et al*, 2009). Our findings showing the dynamic H2B/H4 acetylation regulation during spatial memory consolidation add up to the challenging hypothesis that a specific epigenetic code (specific histone modifications marks) could participate in the regulation of specific memory formation (for reviews see, Wood *et al*, 2006b; Sweatt, 2009).

Increased HATs Expression and Memory Formation

The importance of HAT activity in the formation of LTM is well documented (reviewed by Barrett and Wood (2008)). However, all studies so far reported were performed on mutated mice, and none of them focused on regulations in the normal hippocampus during memory formation. Interestingly, we measured a significant increase in several HATs expression and activity in hippocampal extracts during memory acquisition (Figure 3b and c). It was shown that spatial memorization deficits present in conditional mice expressing a HAT-deficient CBP molecule could be counteracted by extended training (Korzus *et al*, 2004) and that spatial deficits due to brain damage could be reduced by environmental enrichment that correlated with increased histone-tail acetylation (Fischer *et al*, 2007). It is thus possible that upon certain signals, co-activators like CBP, p300, and PCAF might be able to compensate for each other in spatial learning. Unexpectedly, we found that CBP occupancy was not maximal on memory-related genes (such as *bdnf-pIV*), and was even decreased on the *zif268* promoter, otherwise clearly enriched in H2B acetylation (Figure 4). These results suggest an interaction between these related HATs (CBP, p300, and PCAF) during memory formation to orchestrate the modulation of specific memory/plasticity genes necessary for long-term memorization processes. Notably, p300 has a critical role in long-term recognition memory, but not in spatial memory formation (Oliveira *et al*, 2007), whereas PCAF-KO mice present short-term memory and LTM deficits in spatial memorization (Maurice *et al*, 2008). Thus, the way the different HATs actually interfere with each other during (spatial) memorization processes remains an open question. Further investigation is needed with regard to the development of additional technical tools (eg, ChIP antibodies) and studies in other experimental situations (investigation of other memory tasks and time courses).

The final outcome of HAT activation is the induction of histone acetylation on specific genes, which is possible to perform with the use of deacetylase inhibitors. The potential beneficial role of HDACi has been shown in diverse forms of memory formation (Levenson *et al*, 2004; Alarcon *et al*, 2004; Bredy *et al*, 2007; Bredy and Barad, 2008; Lattal *et al*, 2007; Vecsey *et al*, 2007; Fischer *et al*, 2007; Grissom and Lubin, 2009; Stefanko *et al*, 2009). Recently, such molecules have also been successfully tested in animal models of AD (Fischer *et al*, 2007; Ricobaraza *et al*, 2009; Francis *et al*, 2009; Kilgore *et al*, 2010). In spite of the clinical trials of HDACi in cancer therapeutics, there are widespread speculations with regard to the target specificity of these molecules. The HDACs are functional as a class of proteins and not as individual members, and most often they have been shown to compensate for each other's function. In addition, the use of pan-HDACi, by leading to a global

increase in acetylation, would produce an imbalance in acetylation levels within the cells. Most importantly, the use of HDACi might also lead to a loss in the tissue- and signal-specific responses. Hence, several strategies targeted toward direct activation of acetyltransferases have to be attempted. Indeed, by directly placing the correct acetylation marks on chromatin at specific target genes, as we show this is the case during memory formation in this study, these molecules should be able to promote or improve memory consolidation processes necessary for long-term memorization with more specificity than HDACi. Interestingly, potent permeable HAT-activating molecules are being developed (Selvi *et al*, 2008).

CBP Expression and Sensitivity in Neuronal Functions

We show that hippocampal CBP levels increased over the acquisition of a memory task using different techniques (Figures 3 and 4). This appears to be the first report describing a physiological regulation of CBP expression at the system level, which could be relevant to memory formation. So far, CBP upregulations were only described in pathological conditions in some forms of cancer (Karamouzis *et al*, 2002; Comuzzi *et al*, 2004). In fact, CBP levels must be finely tuned as a lowered CBP expression level is deleterious: embryos nullizygous for *cbp* die by embryonic day 10.5 (Oike *et al*, 1999). In humans, the monoallelic mutation of the CBP locus is the genetic basis for Rubinstein-Taybi syndrome (Petrij *et al*, 1995). In mature neurons, loss of the CBP protein or inactivation of its enzymatic activity is a mark of neurodegenerative condition (Rouaux *et al*, 2004; Saha and Pahan, 2006). Thus, competition for recruitment of CBP might provide a potential mechanism for cross-talk between different neuronal functions based on the idea that CBP levels are present in limited concentrations in the cells (Vo and Goodman, 2001).

We propose that increasing the CBP amount during memory formation will increase the CBP-binding possibilities to other transcription factors, thereby widening the expression profile to other target genes, likely to contribute to memory trace consolidation (see model in Figure 7). Moreover, it might increase CBP stability over time, allowing activation of target genes over lengthened delays. The presence of *bdnf*, peaking 12h after a one-trial acquisition (inhibitory avoidance), is an example of late molecular activation necessary for consolidation (Bekinschtein *et al*, 2007). Its specific promoter regulation requires histone acetylation modulation (Bredy *et al*, 2007; Lubin *et al*, 2008).

In this report, we show that the CBP/histone acetylation-dependent pathway, at all levels assessed is no longer recruited during a learning task after a combination of cholinergic and glutamatergic hippocampal denervations, suggesting an active role of these projections in regulating neuronal HAT activity and histone acetylation during memory formation. The combination of these lesions impairs declarative-like memory functions in rats and model aspects of anterograde amnesia, as described in AD patients (Cassel *et al*, 2008). Thus, any method of physiologically modulating CBP levels is of prime interest for memory-related diseases. Indeed, drugs targeted to

increase specific CBP expression could reach the threshold of CBP molecules necessary to activate correct genetic programs with more precisions than solely modulating histone acetylation levels. Pharmacological modulation of CBP levels has been reported recently (Saha et al, 2009): preconditioning of neurons with TNF- α protected them from degenerative conditions (and particularly A β toxicity) through a neuron-specific increase of CBP expression. The authors suggested that an 'adequate' amount of CBP is required at a basal level to ensure pro-survival functions. We have previously shown that CBP was a caspase-6 substrate (Rouaux et al, 2003), a caspase that is activated in AD and MCI patients neurons, as well as during aging (Guo et al, 2004; Albrecht et al, 2007, 2009). Herein, we report that the formation of a new memory is accompanied by dynamic regulations of CBP levels—as well as several other related HATs—in the hippocampus. These data may suggest that CBP levels could actually be modulated throughout our lifetime by environmental cues (including LTM formation), thus enabling normal transcriptional processes required for survival and memory functions.

Epigenetic deregulations are increasingly associated with cognitive disorders (Graff and Mansuy, 2009), including AD (Chouliaras et al, 2010). HAT-activating molecules, not only at the level of their activity, but also at that level of their expression, could result in significant advances in therapeutic strategies aimed at tackling the problem of pathological aging. These discoveries may be particularly important in the treatment of AD-associated illnesses, as therapies that delay memory impairment will decrease healthcare costs and increase quality of life.

ACKNOWLEDGEMENTS

RN is a recipient of a fellowship from the French *Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur*. IP obtained a 2-year grant from Inserm ('poste vert'). We wish to thank the *Fédération de la Recherche sur le Cerveau* (FRC), who brought the research fundings (to ALB) necessary to initiate and support part of this project. Dr K Fisher Ratan (CA, USA) is thanked for critical reading and English proof-reading of the manuscript. This work was supported by the Inserm, 'Association pour la Recherche sur les Maladies Neurodégénératives' (AREMANE) and 'France Alzheimer 67' association for UMRS692 (to JPL), and by the University of Strasbourg and the CNRS for FRE 3289 (to JCC). The authors are grateful to O Bildstein, D Egesi, and G Edomwonyi (FRE 3289) for their assistance in animal care; MJ Ruivo (U692) for her technical assistance; and to S Lithfous for help with regard to the counting of ChAT- and Parv-positive cells.

DISCLOSURE

The authors declare that they have no financial or any other type of involvement that might potentially bias their work and be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85: 525–535.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER et al (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42: 947–959.
- Albrecht S, Bogdanovic N, Ghetti B, Winblad B, LeBlanc AC (2009). Caspase-6 activation in familial Alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin I or presenilin II mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 1282–1293.
- Albrecht S, Bourdeau M, Bennett D, Mufson EJ, Bhattacharjee M, LeBlanc AC (2007). Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *Am J Pathol* 170: 1200–1209.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T et al (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131: 633–636.
- Barrett RM, Wood MA (2008). Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 15: 460–467.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53: 261–277.
- Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gosswiler S, Romashko D et al (2003). A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10518–10522.
- Bredy TW, Barad M (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 15: 39–45.
- 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.
- Cassel JC, Mathis C, Majchrzak M, Moreau PH, Dalrymple-Alford JC (2008). Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to memory loss in dementia and a challenge for transgenic models? *Neurodegener Dis* 5: 304–317.
- Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F et al (2010). Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 90: 498–510.
- Comuzzi B, Nemes C, Schmidt S, Jasarevic Z, Lodde M, Pycha A et al (2004). The androgen receptor co-activator CBP is up-regulated following androgen withdrawal and is highly expressed in advanced prostate cancer. *J Pathol* 204: 159–166.
- Dash PK, Orsi SA, Moore AN (2009). Histone deacetylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience* 163: 1–8.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus *in vivo*. *J Neurosci* 20: 4563–4572.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475–1489.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5: 981–989.
- Dudai Y (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engraver? *Annu Rev Psychol* 55: 51–86.

- Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**: 7–19.
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447**: 178–182.
- Francis YI, Fa M, Ashraf H, Zhang H, Staniszewski A, Latchman DS et al (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **18**: 131–139.
- Frankland PW, Bontempi B (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* **6**: 119–130.
- Gräff J, Mansuy IM (2008). Epigenetic codes in cognition and behavior. *J Neurosci Res* **85**: 525–535.
- Graff J, Mansuy IM (2009). Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci* **30**: 1–8.
- Grissom NM, Lubin FD (2009). The dynamics of HDAC activity on memory formation. *Cell Science* **6**: 44–48.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J et al (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**: 55–60.
- Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **165**: 523–531.
- Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD et al (2010). Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* **30**: 3589–3599.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* **21**: 5089–5098.
- Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, Dwyer JM, Yochum GS, Boss JM et al (2004). Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* **119**: 1041–1054.
- Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**: 1030–1038.
- Karamouzis MV, Papadas T, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG (2002). Induction of the CBP transcriptional co-activator early during laryngeal carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* **128**: 135–140.
- Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD et al (2010). Inhibitors of class I histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **35**: 870–880.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* **42**: 961–972.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007). Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci* **121**: 1125–1131.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* **279**: 40545–40559.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* **28**: 10576–10586.
- Maharana C, Sharma KP, Sharma SK (2010). Depolarization induces acetylation of histone H2B in the hippocampus. *Neuroscience* **167**: 354–360.
- Maurice T, Duclot F, Meunier J, Naert G, Givalois L, Meffre J et al (2008). Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **33**: 1584–1602.
- McGaugh JL (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* **287**: 248–251.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res* **192**: 61–69.
- Müller GE, Pilzecker A (1900). Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtnis. *Z Psychol* **1**: 1–288.
- Oike Y, Takakura N, Hata A, Kaname T et al (1999). Mice homozygous for a truncated form of CREB-binding protein exhibit defects in hematopoiesis and vasculo-angiogenesis. *Blood* **93**: 2771–2779.
- Oliveira AM, Wood MA, McDonough CB, Abel T (2007). Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. *Learn Mem* **14**: 564–572.
- Panteleeva I, Boutillier S, See V, Spiller DG, Rouaux C, Almouzni G et al (2007). HP1 α guides neuronal fate by timing E2F-targeted genes silencing during terminal differentiation. *The Embo J* **26**: 3616–3628.
- Parra MA, Kerr D, Fahy D, Pouchnik DJ, Wyrick JJ (2006). Deciphering the roles of the histone H2B N-terminal domain in genome-wide transcription. *Mol Cell Biol* **26**: 3842–3852.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M et al (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **376**: 348–351.
- Puerta C, Hernandez F, Lopez-Alarcon L, Palacian E (1995). Acetylation of histone H2A.H2B dimers facilitates transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 409–416.
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Perez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Rio J, Garcia-Osta A (2009). Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1721–1732.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81–120.
- Roth TL, Sweatt JD (2009). Regulation of chromatin structure in memory formation. *Curr Opin Neurobiol* **19**: 336–342.
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL (2003). Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J* **22**: 6537–6549.
- Rouaux C, Loeffler JP, Boutillier AL (2004). Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem Pharmacol* **68**: 1157–1164.
- Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Dupuis L et al (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects *in vivo* through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* **27**: 5535–5545.
- Saha RN, Ghosh A, Palencia CA, Fung YK, Dudek SM, Pahan K (2009). TNF-alpha preconditioning protects neurons via neuron-specific up-regulation of CREB-binding protein. *J Immunol* **183**: 2068–2078.
- Saha RN, Pahan K (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* **13**: 539–550.
- Selvi BR, Jagadeesan D, Suma BS, Nagashankar G, Arif M, Balasubramanyam K et al (2008). Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression *in vivo*. *Nano Lett* **8**: 3182–3188.
- Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**: 727–740.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9447–9452.

- Sweatt JD (2009). Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 65: 191–197.
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R *et al* (2007). Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 851–871.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA *et al* (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27: 6128–6140.
- Vo N, Goodman RH (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276: 13505–13508.
- Wood MA, Attner MA, Oliveira AM, Brindle PK, Abel T (2006a). A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13: 609–617.
- Wood MA, Hawk JD, Abel T (2006b). Combinatorial chromatin modifications and memory storage: a code for memory. *Learn Mem* 13: 241–244.
- Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL *et al* (2005). Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 12: 111–119.
- Wyrick JJ, Parra MA (2009). The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: a genomic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1789: 37–44.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Supplemental material and methods.

Animal surgery.

Part of rats (n=40) were subjected to surgery. All surgical procedures were conducted under aseptic conditions according to most steps of the protocol previously published (Traissard et al., 2007). All rats sustained two surgical operations conducted in two steps, 7 days apart, the first one consisting in damaging the entorhinal cortex using N-methyl-D-aspartate, the second one in immunolesioning the cholinergic neurons of the medial septum using 192 IgG-saporin. As we focused on epigenetic regulation in the hippocampus, the cholinergic lesions were confined to the septal region by intraseptal injections of 192 IgG-saporin, whereas in the Traissard et al. study (2007), the lesions also altered a significant part of cholinergic neurons in the nucleus basalis and Purkinje neurons in the cerebellum, as 192 IgG-saporin was injected into the lateral ventricles. Histological verifications of lesion (placement/extent/specificity) are presented in supplemental material and methods. Two different groups of animal were performed: one group consisted of rats in basal conditions and corresponded to sham and lesioned home cage rats (n=10/group), the other group consisted of 3-day trained animals in the hidden platform version of the MWM (sham and lesion, n=10/group), about 3 weeks after the last surgery. ***Lesions of the entorhinal cortex (EC):*** For EC lesions, the rats were anaesthetised using an i.p. injection of pentobarbital (68.4 mg/kg; Ceva Santé Animale, Libourne, France) in saline. Lesions of the EC were performed with multiple injections of small amounts of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA; 40 mM in PBS, pH 7.4) as previously described (Traissard et al., 2007). Briefly, NMDA was injected through a thin glass micropipette lowered into the brain at 6 sites per hemisphere, according to the following coordinates from Bregma (Paxinos and Watson, 1998): Site 1 ; A – 5.6 mm, L \pm 6.5 mm, V – 8.2 mm, Site 2; A – 6.3 mm, L \pm 6.2 mm, V – 8.2 mm, Site 3; A – 6.3 mm, L \pm 4.8 mm, V – 8.4 mm, Site 4; A – 7.0 mm, L \pm 5.1 mm, V – 8.0 mm, Site 5; A – 7.6 mm, L \pm 5.1 mm, V – 7.0 mm, Site 6; A – 8.3 mm, L \pm 4.6 mm, V – 5.0 mm. Injection volumes were 0.1 μ l in site 1, 0.2 μ l in sites 2 and 3, 0.3 μ l in sites 4 and 5, and 0.4 μ l in site 6. NMDA was injected at a flow rate of 0.2 μ l/min at each site. The micropipette was

left in place for 1-4 min before being retracted. Surgery in sham rats was similar except that no injection was made. **Lesions of the basal forebrain (BF) cholinergic neurons:** One week after EC lesions, rats were anaesthetized with i.p. injections of ketamine 100 mg/kg, 15 min after having received an i.p. injection of diazepam 3 mg/kg. Rats were subjected to injections into the medial septum and the vertical limb of the diagonal band of Broca of 192 IgG-saporin (at a concentration of 1.0 µg/µL of phosphate-buffered saline, Advanced Targeting System, San Diego, CA, USA, batch ##24-87) or of its vehicle (sham). Coordinates were (in mm from Bregma): A, +0.6; L, ± 0.2; V, -7.2 for the vertical limb of the diagonal band of Broca (0.1 µl/site, 2 sites) and V, -6.5 for the median septum (0.1 µl/site, 2 sites). The incisor bar was set at the level of the interaural line. At each site, after each injection, the needle was left *in situ* for 6 min before being retracted slowly.

Histological verifications in double lesion model

Preparation of tissue sections: After completion of the probe trial in the MWM, rats were decapitated, the brain removed and the dorsal hippocampus and the adjacent cortex were dissected separately on ice for biochemical analyses (see Methods section of the paper). The remaining brain was then post-fixed over 8 hrs with 4% paraformaldehyde (in 0.1 M PB; 4°C) and cryoprotected for 60 hr (at 4°C) in a 20% sucrose solution (in 0.1 M PB; 4°C). The brains were then snap-frozen in isopentane at -40°C and subsequently kept at -80°C until sectioning on a freezing microtome (Reichert Jung cryostat, Frigocut 2800) in coronal sections (40 µm thick).

Acetylcholinesterase histochemistry and cresyl violet staining: Sections were collected onto gelatine-coated slides and dried at room temperature. They were stained either with cresyl violet, according to Klüver and Barrera (1953) in order to identify the extent of EC lesion sites (which was confirmed on a few sections stained with anti-NeuN immunohistochemistry; see below), or for acetylcholinesterase (AChE) histochemistry according to Koelle (1954) with slight modifications in order to verify the extent of the cholinergic denervation in both the cortical mantle and the hippocampus. In the hippocampus, AChE activity is considered a reliable indicator of the degree of cholinergic innervation.

Quantification of AChE-positive staining: The extent of the cholinergic denervation was quantified by optical density (OD) measurements. Using a computer-assisted image analysis system (SAMBA Technologies, Meylan, France) coupled to a monochrome CCD digital Sony (Japan) video camera (Model XC 77CE) equipped with a 60 mm Nikon objective (Nikkor) and a Triplux extension tube, the mean OD was measured on digitalized images after precise delineation of each brain region of interest (i.e., the visual cortex, the auditory-perirhinal and entorhinal cortices, the amygdala, and the posterior hippocampus, in both its dorsal and ventral parts). For digitalization, sections were placed on a Kaiser Prolite 5000 light box (Kaiser Fototechnik, Buchen, Germany). Magnification from section to computer screen was 25. The mean OD considered as a “background” and subtracted from all measures before analysis was obtained from a value taken for each rat in the corpus callosum, where almost no AChE-positive reaction products could be identified. The experimenter performing the OD assessments was not aware of the rat’s treatment.

Anti-cholineacetyltransferase (ChAT), and anti-parvalbumine (Parv)

immunostaining: Anti-ChAT immunostaining was used to visualize the effects of 192 IgG-saporin on cholinergic neurons in the septum, diagonal band of Broca, nucleus basalis magnocellularis (NBM) and, as a control, for the selectivity of the toxin for basal forebrain cholinergic neurons, in the striatum. Anti-Parv immunostaining was used to control for possible effects of 192 IgG-saporin on GABAergic neurons in the septal region. For detailed immunohistological procedures see Traissard et al. (2007). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in PBSM (0.1 M PBS, pH 7.4, 0.02% merthiolate) before being soaked for 1 hr in 5% normal donkey serum (BioWest, Nuaille, France) in PBSM containing 0.5% Triton X-100. Then, the sections were transferred into the primary antibody solution (a goat polyclonal antibody directed against ChAT (1:1000, Chemicon International) or a mouse monoclonal antibody directed against Parv (1:4000, Sigma-Aldrich P3088)) for 18 hrs at room temperature. Then, all the sections preincubated with the anti-ChAT primary antibody were soaked for 1 hr in a buffer solution containing biotinylated donkey anti-goat antibody (1:500; Vector Laboratories International), and those preincubated with the anti-Parv primary antibody were soaked in a buffer solution containing biotinylated horse anti-mouse antibody (1:500; Vector

Laboratories International). After three PBSM washes, the sections were incubated for 45 min in a standard avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories). The slices were then rinsed twice in PBSM and once in 0.6% Tris-buffer (pH= 7.6) and exposed to a solution of 0.0125% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) in Tris-buffer containing 0.0075% H₂O₂ until background staining saturation. Finally, after 3 PBSM rinses, the sections were mounted onto gelatine-coated slides, dried at room temperature, dehydrated and cover-slipped.

ChAT- and Parv-positive cell counting: To get an estimation of the lesion extent/selectivity induced by 192 IgG-saporin, anatomical landmarks were used to select, define, and standardize the location of counting frames of a set size in the medial septum (MS), the vertical limb of the diagonal band of Broca (vDBB), and the NBM as previously described (Traissard et al., 2007). Briefly, counting was made bilaterally on a particular section corresponding to an anteriority of Bregma +0.20 mm for counting in the MS and vDBB, and Bregma -1.4 mm for counting in the NBM. The number of ChAT- and Parv-positive neurons was determined separately in the MS, vDBB, and NBM (countings from left and right hemispheres added). For detailed anatomical localization of cell counting, see Traissard et al. (2007).

NeuN immunostaining: To complete the histological characterization of the EC lesion, a NeuN immunohistochemistry was realized in part of the sections. As for anti ChAT- and anti Parv-immunostaining (see upper paragraph), the sections were rinsed three times during 10 min in PBSM before being soaked for 1 hr in 5% normal donkey serum in PBSM containing 0.5 % Triton X-100. The sections were subsequently transferred into the primary antibody solution, a mouse NeuN antibody (1:2000, Chemicon International, ref MAB377) for 18 hr at room temperature. Then, the sections were soaked in a buffer solution containing biotinylated anti-mouse horse antibody (1:500; Vector Laboratories International). The next steps were exactly the same as for the Parv- and ChAT immunohistochemistry procedure described above.

References

Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, Pernon A, Majchrzak

M, Cassel JC (2007) Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:851-871.

Klüver H, Barrera E (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12:400–403.

Koelle GB (1954). The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 100:211–235.

Immunolabeling of rat hippocampic neurons.

Five rats of each condition (VPf and HPf) were deeply anesthetized with an ip injection of pentobarbital (200 mg/kg) and perfused transcardially with 150 ml of ice-cold paraformaldehyde (4% in 0.1M PB, 4°C). Brains were rapidly removed from the skull and post-fixed for 2 hr in the same fixative at +4°C. Brains were then frozen and The dorsal hippocampus region (from -2.30 to -4.16 mm from Bregma, according to Paxinos and Watson, 1998) was cut into 20 µm thick slices with a cryostat. Permeabilization was performed with PBS1X/Triton 2% during 15 min. Unspecific labelling was blocked with PBS1X/Triton 0,1%/Horse serum 5% during 30 min at 37°C. Slices were incubated overnight with polyclonal anti CBP (1/100) antibody (sc-369, Santa Cruz biotechnology, CA, USA) or polyclonal anti acetylated-H2B K12K15 (1/250) antibody (ab1759, Abcam, Cambridge, UK) or MAP2 antibody (M4403, SIGMA, St Louis, MO) in PBS1X/Triton 0,1%/Horse serum 5%. Secondary antibodies were a alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L) and alexa Fluor 594 donkey anti mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, CA, USA). Slices were incubated with the Hoechst dye 33342 (1 mg/ml ; 5 min) and mounted in mowiol for observation. Acquisitions were performed with a Nikon Digital Camera DXM 1200 (NIS-Elements F 2.20).

Primers for PCR amplifications.

| Gene name | Sequences | Amplicon size |
|-------------------|---|----------------------|
| BDNF_EIV | L: 5'-GAG-CAG-CTG-CCT-TGA-TGT-TT-3' R: 5'-GTG-GAC-GTT-TGC-TTC-TTT-CA-3' | 148 |
| Zif268 | L: 5'-TAC-GAG-CAC-CTG-ACC-ACA-GA-3' R: 5'-GGG-TAG-TTT-GGC-TGG-GAT-AAC-3' | 91 |
| cFos | L: 5'-GGG-ACA-GCC-TTT-CCT-ACT-ACC-3' R: 5'-GAT-CTG-CGC-AAA-AGT-CCT-GT-3' | 87 |
| Fos B | L: 5'-TGC-AGC-TAA-ATG-CAG-AAA-CC-3' R: 5'-CTC-TTC-GAG-CTG-ATC-CGT-TT-3' | 73 |
| CBP | L: 5'-AAG-AAT-ATG-GCT-CCG-ATT-GC-3' R: 5'-TGA-GGA-TCT-CAT-GGT-AAA-CAG-C-3' | 120 |
| P300 | L: 5'-AAG-CAC-CAG-TGT-CTC-AAG-CA-3' R: 5'-CCC-TGG-AGG-CAT-TAT-AGG-AGA-3' | 71 |
| PCAF | L: 5'-GCT-TTA-CAG-CAC-GCT-CAA-GA-3' R: 5'-GTT-CCA-TGA-AGG-GCC-AAG-3' | 71 |
| Tip60 | L: 5'-ACA-ATG-TGG-CCT-GCA-TCT-T-3' R: 5'-CTT-CTA-CTT-TCG-AGA-GTT-CAT-AGC-TG-3' | 96 |
| RNA PolIII | L: 5'-TTC-GGC-TCA-GTG-GAG-AGG-3' R: 5'-GCT-CCC-ACC-ATT-TCT-CCA-G-3' | 94 |
| 18S | L: 5'-TTC-CTT-GGA-TGT-GGT-AGC-CG-3' R: 5'-CGT-CTG-CCC-TAT-CAA-CTT-TCG-3' | 120 |

Optical density and area measurements.

Quantification of the relative optical densities (OD) of neuronal CBP immunoreactivity was examined in 6 to 8 coronal 40 µm-thick sections of the dorsal hippocampus per rat by an experimenter blind to the experimental conditions. Stained sections were observed using a Leica DM5500B light microscope (x10 objective lens) and digitalized using a video camera (Optronics Microfire) online with an image analyzer (Explora Nova, La Rochelle, France). OD measurements were performed using a densitometry software program (Mercator) on two areas of the dorsal hippocampus: the CA1 pyramidal cell layer (over about 1.6 mm in the mediolateral plan) and the whole dentate gyrus granular (DG) layer. The same intensity of light in the microscope as well as the same parameters in the digital camera were used for all sections. After delimitation of the

region of interest, the OD measurements of the neuronal layer were performed by selecting a threshold value that keeps all labeled immunopositive elements but no background. The ODs measured in the stratum radiatum layer, and thus a region devoid of cell bodies, the OD of the auditory cortex was also measured as a control to verify the absence of increase of CBP levels during memory formation in this area. Indeed, the auditory cortex present on the same sections along with the dorsal hippocampus, appeared a good candidate as it seemed reasonable to expect minimal effects of learning in this area; its sound or noise-related activation should be comparable in HPf and VPf rats. was subtracted from the ODs corresponding to the CBP immunoreactivity in the defined areas of interest. The statistical analyses were performed using a two-way ANOVA considering Platform visibility (VPf, HPf) and Region (CA1, DG) as factors. Post hoc comparisons used the Newman–Keuls multiple range test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Primers for PCR amplifications after chromatin immunoprecipitation.

Rat *Bdnf-pIV* primers have been described in Ou and Gean (2007). *Beta-actin* served as positive control and primers were from ChIP-IT TM Control Kit – Rat (53012, Active Motif). The different primers for rat *cFos*, *FosB* and *Zif268* proximal promoter regions PCR amplification were designed as follow (Str.: strand; Chr.: chromosome):

| Gene name | Gene ID / NCBI Ref Seq | Str./Chr. | Primer sequence | Position |
|---------------|------------------------|-----------|--|----------------------------|
| cFos | 314322 / NC_005105.2 | (+) / 6 | L : 5'-AACCATCCCCGAAATCCTAC-3' R : 5'-AGCGGAACAGAGAAACTGGA-3' | 109,558,890 109,559,074 |
| <i>FosB</i> | 308411 / NC_005100.2 | (-) / 1 | L : 5'-GTGAGGGGACTGCATCCTTA-3' R : 5'-GCTGGTGAAAAAGAGCAAGG-3' | 78,674,443 78,674,338 |
| <i>Zif268</i> | 24330 / NC_005117.2 | (+) / 18 | L : 5'-ATGGGAGGTCTTCACGTCAC-3' R : 5'-CGAATCGGCCTCTATTTCAA-3' | 27,343,404 27,343,543 |
| <i>cbp</i> | 24330 / NM_133381.2 | (+) / 10 | L : 5'-GTGAAGATGGCCGAGAACTT -3' R : 5'-CAACCTCACCTGTGCTGTCA -3' | 11,598,546 11,599,226 |

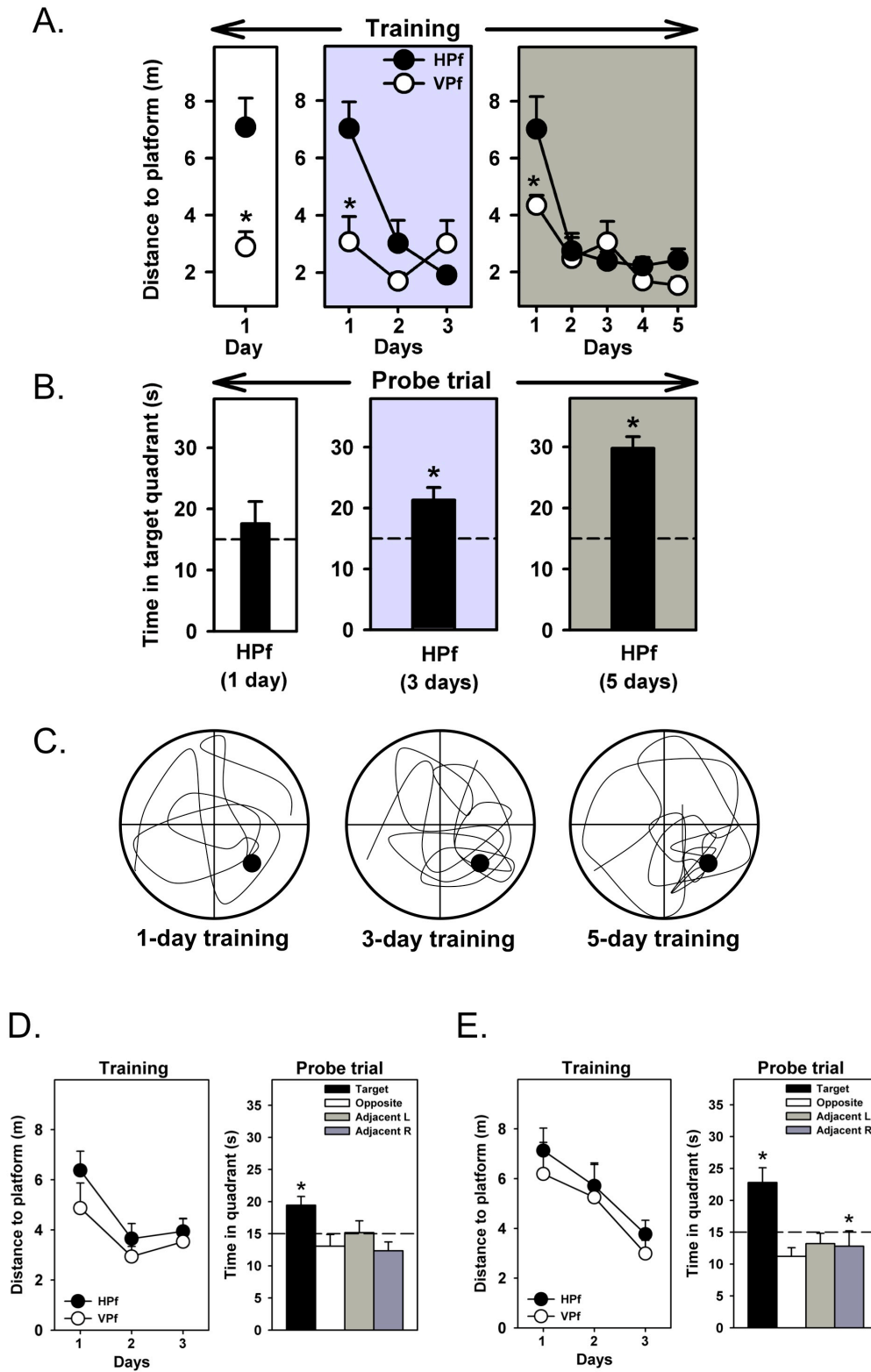


Figure S1

Cerebellum

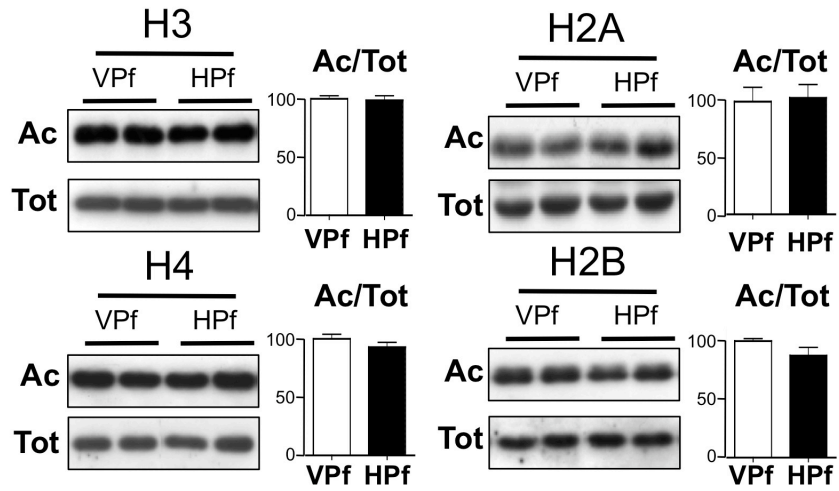


Figure S2

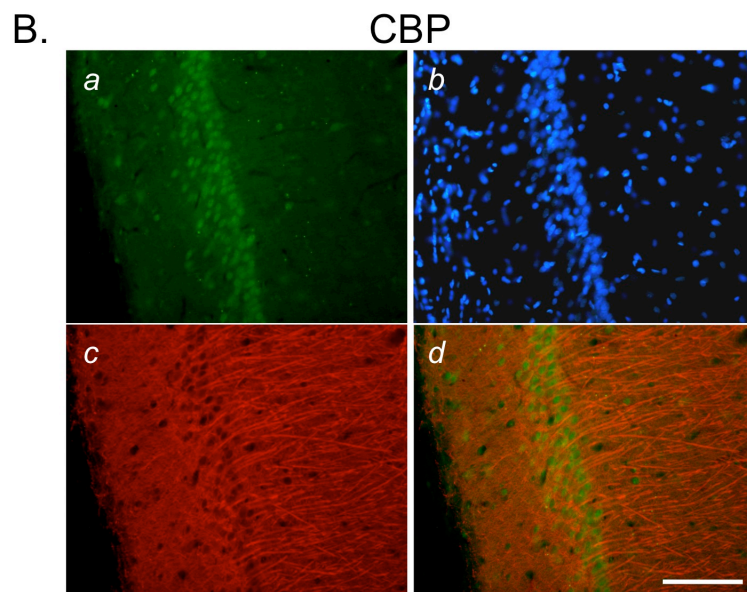
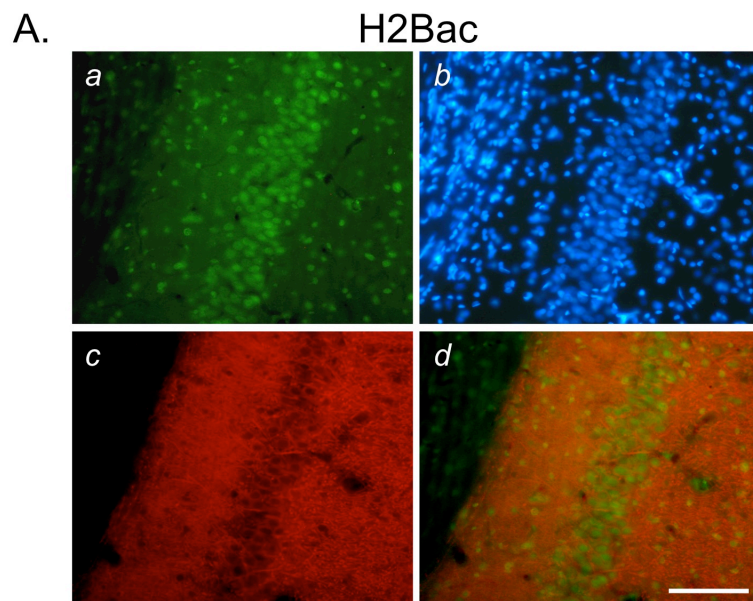
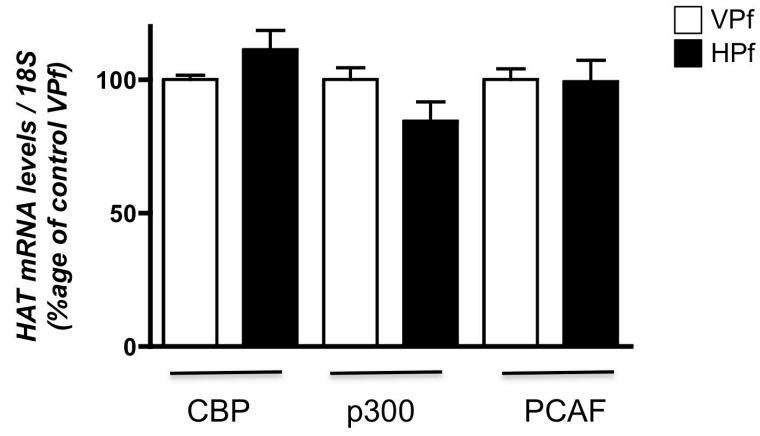


Figure S3

A.



B.

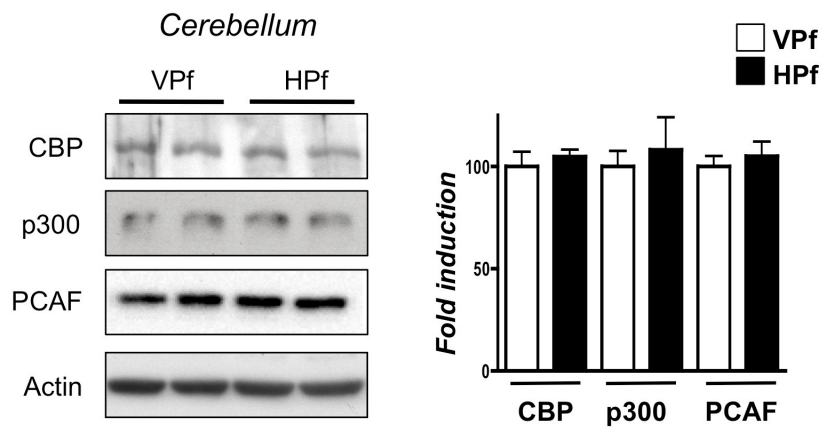
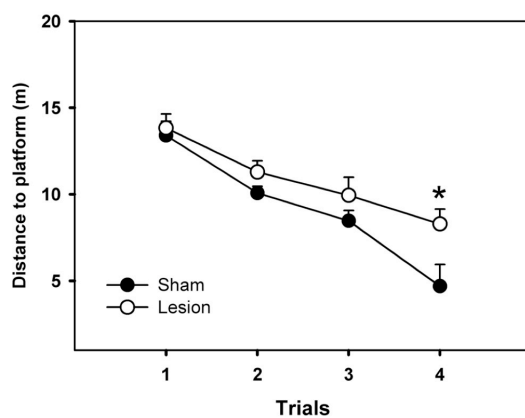


Figure S4

A.

| Brain Region | Sham | Lesion |
|--|--------------|---------------------|
| OD of AChE staining (arbitrary units) | | |
| Visual cortex (V1, V2) | 140 ± 16 | 147 ± 16 |
| Auditory and perirhinal cortices | 243 ± 30 | 327 ± 40 |
| Entorhinal cortex | 460 ± 68 | 429 ± 66 |
| Amygdala | 948 ± 106 | 847 ± 156 |
| Posterior hippocampus, dorsal | 1030 ± 83 | 556 ± 151 * (-47%) |
| Posterior hippocampus, ventral | 714 ± 97 | 378 ± 89 * (-47%) |
| ChAT-positive neurons | | |
| Medial septum | 41.5 ± 5.0 | 6.3 ± 1.3 * (-85%) |
| Diagonal band of Broca (vertical limb) | 19.1 ± 0.8 | 3.3 ± 1.6 * (-83%) |
| Nucleus basalis magnocellularis | 129.2 ± 21.4 | 89.0 ± 9.2 * (-31%) |
| Parv-positive neurons | | |
| Medial septum | 21.5 ± 2.4 | 14.5 ± 4.3 |
| Diagonal band of Broca (vertical limb) | 33.5 ± 2.5 | 17.4 ± 4.8 * (-48%) |
| Nucleus basalis magnocellularis | 33.0 ± 3.3 | 26.3 ± 3.0 |

B.



C.

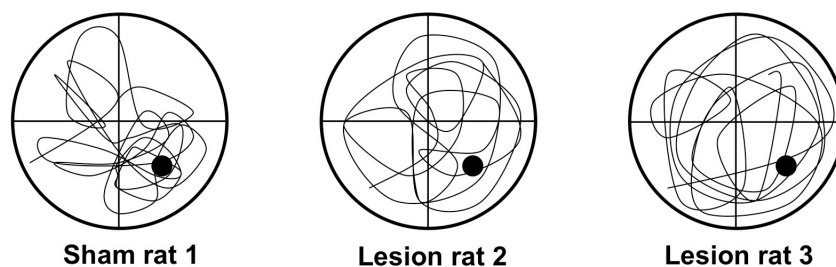


Figure S5

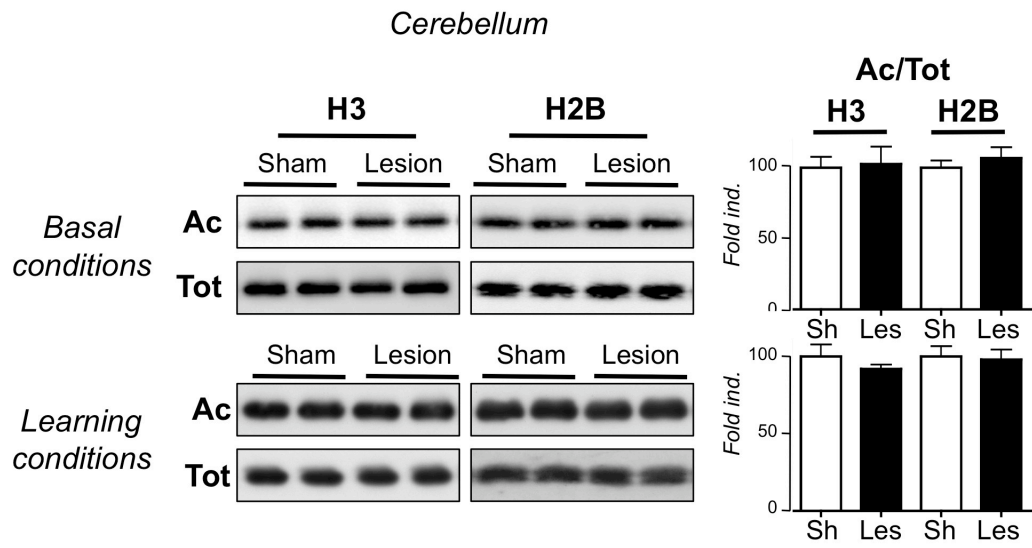


Figure S6

Supplemental legends:

Supplemental figure 1: Behavior analysis of rats during the time course of spatial memory formation in the Morris water maze. Water maze performance of two groups of rats ($n = 15$ in each group at the start of training) over a 5-day training period. Rats were trained for 1 (A, left), 3 (A, middle) or 5 days (A, right), for part of them with a visible platform (VPf), for the other part with a hidden one (HPf). The VPf group had to swim to a platform whose location was changed from trial to trial. The HPf group had to swim to a platform that was kept at the same location for all trials. **(A)** Acquisition data are expressed as mean (\pm SEM) distances to reach the platform on each day. HPf rats showed a marked improvement between day 1 and day 2, and reached an almost maximal performance on day 3. * $p < 0.01$, significantly different from HPf group. In the control group, whatever the number of subsequent training days (i.e., no, 2 or 4), VPf rats showed an average distance that was significantly shorter ($p < 0.01$ in the 1-day, 3-day and 5-day groups) as compared to that found in HPf rats. Over 5 days, performance did further improve (i.e. distance to reach the platform did further decrease) on subsequent days, especially after day 3, indicating that the control rats were able to gain in detection efficacy and/or swim efficiency (day 5 vs. day 1, $p < 0.05$). **(B)** At days 1, 3 and 5, randomly chosen rats in the HPf group were subjected to a probe trial (60 s), performed 1hr after the last training. VPf rats were only given a one-trial swim to visible platform trial. Mean time in the target quadrant (\pm SEM) showed performance which improved as a function of the number of training days: after 3 or 5 days of acquisition, rats showed a performance that was significantly above chance (i.e., 15 s) and which accounted for the retention of the platform location. * $p < 0.05$, significantly above chance (dashed line). **(C)** Typical swim tracks obtained after each training day (as noted) for rats navigating to the hidden platform. The former location of the platform is indicated by the black-filled circle in the south-east quadrant. **(D)** Water maze performance in rats ($n=8$ /group) trained over 3 consecutive days (4 trials/day) and used for the ChiP and nuclear extract experiments. See legend of Figure 1A and Method section for detailed behavioral protocol. Left: Acquisition data are expressed as mean (\pm SEM) distance to reach the platform. In both groups a significant decrease of the

distance to reach the platform over days was observed (two-way ANOVA: $F_{(2,28)} = 8.56$, $p < 0.005$). Right: Probe trial performance in the HPf rats expressed as the mean search time in each of the four quadrants (\pm SEM). Performance was above chance level (i.e., 15 s) only in the target quadrant ($t_7 = 3.23$, $p < 0.05$), whereas time in the three other quadrants was at chance level ($t_7 = -1.07$ or -1.92 or 0.09 , $p > 0.05$ for the opposite, adjacent left and right quadrants, respectively). * $p < 0.05$, significantly different from chance. **(E)** Water maze performance in rats ($n=5$ /group) trained over 3 consecutive days (4 trials/day) and used for the Immunohistochemistry experiment. See legend of Figure 1A and Method section for detailed behavioral protocol. Left: Acquisition data are expressed as mean (\pm SEM) distance to reach the platform. In both groups a significant decrease of the distance to reach the platform over days was observed (two-way ANOVA: $F_{(2,16)} = 4.55$, $p < 0.05$). Right: Probe trial performance in the HPf rats expressed as the mean search time in each of the four quadrants (\pm SEM). Performance was above chance level (i.e., 15 s) only in the target quadrant ($t_4 = 3.89$, $p < 0.05$), whereas time in the three other quadrants was either at chance level ($t_4 = -0.91$ or -1.11 , $p > 0.05$ for right and left quadrants, respectively) or significantly underneath ($t_4 = -3.39$, $p < 0.05$ for opposite quadrant). * $p < 0.05$, significantly different from chance.

Supplemental figure 2: Measurement of histone acetylation levels in the cerebellum during the formation of a spatial memory. Acetylated (Ac) and total (Tot) histone levels were measured by Western blot analyses for each histone core in histone extracts obtained from the cerebellum of the same rats used in figure 1B (3-day trained rats; HPf *versus* VPf; $n = 7$ per group). Lysine acetylations measured were H3K9K14, H4K12, H2AK9 and H2BK5K10K15K20. Typical western blots are represented in duplicates. Quantified results are represented as fold induction of the Ac/Tot ratio for each histone, the ratio obtained in the control condition being arbitrarily set at 100%. A student *t*-test revealed no significant change between both groups (VPf *versus* HPf) for each core histone.

Supplemental figure 3: Acetylated-H2B and CBP/MAP2 immunofluorlabelings in hippocampic neurons. **(A)** Acetylated-H2B/MAP2 co-labeling was performed by

immunofluorescence on rat brain sections. Representative photographs of the CA1 region are shown for acetylated H2B (a), MAP2 (c) and merged (d) labelings. The total number of cells is visualized by Hoechst staining of nuclei (b). H2B is acetylated in most of the cells. **(B)** A CBP/MAP2 co-labeling was performed by immunofluorescence on rat brain sections. Representative photographs of the CA1 region are shown for CBP (a), MAP2 (c) and merged (d) labelings. The total number of cells is visualized by Hoechst staining of nuclei (b). CBP is primarily expressed in pyramidal neurons as compared to other cells. Scale bar: 50 μ m.

Supplemental figure 4: HAT protein expression. **(A)** CBP, p300 and PCAF mRNA expression levels were evaluated by RT-qPCR in the dorsal hippocampus of control (Visible platform, VPf) and learning (Hidden platform, HPf) groups after a 1- day training period in the MWM (n=6/group). Values were normalized to the 18S ribosomal subunit and the fold inductions. Student *t*-test: *ns*: non significant. **(B)** HAT levels were assessed by western blot in nuclear protein extracts prepared from the cerebellum of control (Visible platform, VPf) and learning (Hidden platform, HPf) rat groups. Typical blots are shown in duplicates. Blots were quantified (n=7 per group) and results normalized against actin are shown (right). A student *t*-test revealed no significant difference in the amount of the different HATs between the two groups.

Supplemental figure 5: Histological verification of lesions (A), visible platform data (B) and typical swimming tracks (C) in Lesion rats. **(A) Effects of intraseptal injections of 192 IgG-saporin on the optical density (OD) of AChE staining in various brain structures and on the number of ChAT- and Parv-positive neurons in the basal forebrain.** Data are presented as means \pm SEM. They illustrate the effect of the double lesion on cholinergic markers in various brain structures: AChE stands for acetylcholinesterase, ChAT for choline acetyltransferase, Parv for parvalbumine, V1 and V2 for visual areas 1 and 2, respectively. The number of neurons indicated is that counted on both sides. * Significantly different from Sham, $p < 0.05$. Between brackets in the right column are the significant lesion-induced effects given in % reduction from sham values. Analysis of the ODs found in the different brain regions analyzed only

revealed a significant difference in the dorsal ($F_{(1,17)} = 8,7, p < 0.01$) and in the ventral ($F_{(1,17)} = 6,9, p < 0.05$) portions of the posterior hippocampus, confirming a partial cholinergic denervation of the hippocampus. In the basal forebrain, we also found evidence for relatively selective lesions of the septal cholinergic neurons. Indeed, the number of ChAT-positive neurons was reduced by 85% and 83% in the medial septum and vertical limb of the diagonal band of Broca, respectively, and both decreases were significant ($F_{(1,19)} = 42.7$ and 9.8 , respectively, $p < 0.01$). In the nucleus basalis magnocellularis (NBM), the decrease was much weaker (-31%), but reached significance ($F_{(1,19)} = 10,2, p < 0.01$). Concerning the number of Parv-positive neurons, we found no significant modification in the medial septum and in the NBM, but in the vertical limb of the diagonal band of Broca, the decrease (-48%) was significant ($F_{(1,19)} = 9,4, p < 0.01$). Thus, although the lesions did not reach an exclusively cholinergic impact, they appeared as relatively selective, both anatomically and neurochemically, as they achieved their maximal cholinergic effect in the medial septum and the vertical limb of the diagonal band of Broca. The weaker effects of 192 IgG-saporin in the NBM can be explained by diffusion of small amounts of the immunotoxin, the septum and the NBM being contiguous regions. The damage to Parv-positive neurons, when observed, is usually interpreted as a consequence on closely neighboring regions of toxic products that are released by cholinergic neurons during their 192 IgG-saporin-triggered degeneration.

(B) Water-maze performance with a visible platform during one session of 4 consecutive trials in Sham versus operated rats. Average distances (\pm SEM) to reach the platform in rats subjected to sham operations (Sham) or lesions (Lesion) showed a significant decrease over trials in both groups (two-way ANOVA: $F(3,57) = 37.11, p < 0.005$), although Sham rats were better than Lesion rats on the 4th trial ($p < 0.005$). In addition, the group effect showed a tendency toward significance ($F(1,19) = 4.00, p = 0.06$), but there was no interaction between the two factors ($F(3,57) = 1.95, p > 0.05$). The average performance over the 4 consecutive trials did not differ significantly between the two groups: 9.2 ± 0.5 (s.e.m) for Sham-operated versus 10.8 ± 0.7 (s.e.m) for the Lesion rats (Student's t test, $p=0.06$).

(C) Typical swimming tracks corresponding to retention of rats presented on figure 5B. Swimming tracks were recorded during the probe trial (performed 1hr after the last acquisition trial) in rats trained for 3 consecutive days. Rats were subjected to a sham-operation (Sham rat 1) or to a double lesion combining NMDA injections into the entorhinal cortex and 192 IgG-saporin injections into the medial septum (Lesion rat 2, Lesion rat 3). The former location of the platform is indicated by the black-filled circle in the south-east quadrant.

Supplemental figure 6: Evaluation of histone H3 and H2B acetylation levels in the cerebellum in the double lesioned rat model. Acetylated (Ac) and total (Tot) histone levels were measured by Western blot analyses for H3 and H2B histones in total extracts obtained from the cerebellum of home cage rats (Basal conditions; Sham, n = 6; Lesion, n = 7) or of trained rats (Learning conditions: HPf group during 3 days for all rat groups; Sham, n = 7; Lesion, n = 7). Lysine acetylations measured are H3K9K14 and H2BK5K10K15K20. Typical western blots are represented in duplicates. Quantified results are represented as fold induction of the Ac/Tot ratio for each histone. The ratio obtained in the control condition is arbitrarily set at 100%. Sham, Sh; Lesion, Les. A student *t*-test revealed no significant difference between groups and conditions.

INTRODUCTION

Différentes données indiquent un rôle possible de la perte de fonction de CBP et des conséquences de cette perte sur les acétylations qui en sont dépendantes, non seulement dans les déficits de mémoire à long terme, mais aussi dans les événements à l'origine de la mort neuronale durant la MA.

Nous émettons l'hypothèse qu'au cours de la MA, de manière précoce, les niveaux de CBP, qui sont déterminants pour la protection neuronale, subissent une dégradation sélective. Ceci aurait pour effet d'agir non seulement au niveau des neurodégénérescences, mais aussi de certaines fonctions de mémorisation. En effet, les patients atteints de la MA sont incapables, à un stade précoce de la maladie, d'apprendre une nouvelle tâche ou une nouvelle information et présentent notamment des troubles de la mémoire spatiale.

Les objectifs de ce travail sont :

1) de comprendre l'implication de CBP (et d'autres HAT), ainsi que des acétylations, dans la formation de la mémoire à long terme (mécanismes de consolidation synaptique).

De nombreuses études sur des souris transgéniques ont montré l'implication de CBP dans la formation de la mémorisation à long terme, mais à l'heure actuelle, l'expression de ces enzymes HAT n'a jamais été étudiée au cours du processus de mémorisation. De même, une régulation de l'acétylation des histones durant une tâche de mémorisation spatiale n'a jamais été étudiée.

Ainsi, nous étudierons les mécanismes dépendants des acétylations au cours d'un apprentissage spatial dans l'hippocampe dorsale de rat. Pour cela nous utiliserons le test de la piscine de Morris (*Morris water maze*) impliquant la mémoire spatiale et qui est un test dépendant de l'hippocampe.

Nous étudierons des rats ayant suivi un apprentissage sur le long terme en piscine de Morris, le groupe de rats doit apprendre à localiser une plateforme refuge qui est cachée sous la surface de l'eau (*hidden platform HPf*). La plateforme reste à un endroit fixe permettant aux rats d'associer sa position à l'environnement et de mémoriser sa localisation. Afin de comparer les niveaux d'expression mesurés durant la formation de la mémoire, nous avons formé un groupe contrôle de rats entraînés dans des conditions expérimentales similaires, sauf qu'ils n'ont pas à apprendre la localisation d'une plateforme cachée mais à nager vers une plateforme visible (*visible platform VPf*). Quelques soient les modifications moléculaires qui se produisent dans l'hippocampe dorsal de ces contrôles durant la nage, elles vont être en

rapport avec le traitement du contexte (navigation, stress, nage, etc), mais pas avec l'apprentissage spatial. Les niveaux d'expression mesurés dans le groupe HPf par rapport au groupe VPf devraient ainsi correspondre à l'apprentissage spatial.

2) de comprendre si et comment ces mécanismes sont touchés dans des modèles pathologiques mimant les déficits cognitifs de la MA.

Nous étudierons ces processus dans un modèle de rat lésé développé par le laboratoire de Neurosciences Comportementales et Cognitives (Traissard et al., 2007). Ces rats présentent des troubles de l'apprentissage spatial. Ces mécanismes seront comparés entre des rats non lésés (*sham* opérés) et des rats lésés, chacun des 2 groupes étant analysé lors d'un apprentissage spatial et sans apprentissage (en basal).

L'étude de ces modifications épigénétiques impliquées dans les processus de mémorisation nous permettra peut être de mettre en évidence de nouveaux marqueurs moléculaires (par exemple : CBP, acétylations). Ces marqueurs pourraient ainsi devenir d'éventuelles cibles thérapeutiques dans l'objectif d'améliorer les troubles cognitifs dans les pathologies de la mémoire telles que la maladie d'Alzheimer.

CONCLUSIONS

Ces expérimentations ont révélé 3 points fondamentaux dans la formation et la consolidation de la mémoire qui suggèrent des stratégies thérapeutiques prometteuses. Dans un premier temps, nos expériences ont permis de mettre en évidence une régulation différentielle du profil d'acétylation des histones dans l'hippocampe pendant la consolidation de la trace de la mémoire (3 jours d'apprentissage en piscine de Morris) chez des rats normaux. Nous avons montré, pour la première fois une augmentation de l'acétylation de l'histone H2B durant un apprentissage spatial, lequel peut être fonctionnellement lié à l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la mémoire et la plasticité. Par ailleurs, l'acétylation de H3 apparaît réactive au contexte environnemental plutôt qu'au test d'apprentissage en lui-même. Cela signifie que l'acétylation de H2B peut représenter un marqueur épigénétique de la mémoire à long terme pour l'information spatiale.

Dans un second temps, après 3 jours d'apprentissage en piscine de Morris, nous avons trouvé une augmentation de plusieurs HAT, incluant CBP, aussi bien au niveau de l'expression transcriptionnelle que protéique, ainsi qu'une augmentation de l'activité HAT dans l'hippocampe dorsal.

Enfin, dans un modèle de rat combinant 2 lésions qui ont été décrites dans la MA et entraînant des perturbations des processus mnésiques notamment de reconnaissance spatiale, nous avons mis en évidence un dysfonctionnement de la voie CBP/acétylation des histones après 3 jours d'apprentissage en piscine de Morris.

A. Un lien potentiel entre l'acétylation de l'histone H2B et la formation de la mémoire.

Les modifications épigénétiques spécifiques en relation avec la mémoire à long terme est une hypothèse intéressante (Graff and Mansuy, 2008 ; Sweatt, 2009) et différents travaux se sont intéressés aux modifications post traductionnelles des histones, principalement les acétylations, durant l'acquisition d'une tâche (pour revue Barret and Wood, 2008). On peut noter la première démonstration de modification épigénétique dans le génome en relation avec la mémoire à long terme vient de Sweatt et collaborateurs, qui ont montré une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe de souris soumises à un test de conditionnement à la peur (Levenson et al., 2004).

Nous avons tout d'abord montré que non seulement les acétylations des histones H3 et H2A ne variaient pas, mais les formes acétylées des histones H2B et H4 étaient

significativement augmentées dans l'hippocampe dorsal de rats consolidant une tâche d'apprentissage spatial. Cependant, les acétylations des histones H3 étaient augmentées de manière importante après trois jours d'entraînement dans les deux versions de la piscine de Morris (HPf et VPf) par rapport aux contrôles non entraînés (*home cage* HC). Cette augmentation peut être une conséquence d'adaptation au test, les rats ont à faire face au stress, à la peur, ils doivent nager et il existe des processus basiques liés à la navigation dans les 2 versions du test. Par conséquent, il est possible que l'acétylation de H3 modifie la structure de la chromatine afin de promouvoir la transcription de gènes spécifiques recrutés pour de tels processus adaptatifs. Une autre hypothèse serait que l'acétylation de l'histone H3 permette de préparer la chromatine, en apportant un « premier degré » d'ouverture de la chromatine, pour la transcription de gènes requis dans les processus de mémorisation, qui s'effectueraient de manière spécifique grâce à l'acétylation de l'histone H2B et de l'histone H4 qui apporterait un « deuxième degré » d'ouverture de la chromatine au niveau de gènes spécifiques. Néanmoins, en comparant ces 2 groupes de rats (HC versus VPf), les niveaux d'acétylation de H2B restent inchangés (figure 1C), confirmant que l'augmentation observée entre les rats qui ont appris et les rats contrôles (HPf versus VPf, figure 1B) est spécifique de l'acquisition de la mémoire à long terme et/ou spatiale.

Jusqu'à maintenant, les études des fonctions de l'acétylation de H2B étaient nombreuses chez les levures (Wyrick and Parra, 2009), mais limitées chez les mammifères. Il serait maintenant intéressant d'identifier les gènes cibles de l'acétylation de H2B et leur pertinence dans la consolidation de la mémoire spatiale dans les neurones hippocampiques. Il a été montré une diminution de l'acétylation de l'histone H2B dans l'hippocampe des souris *cbp*^{+/-} (Alarcon et al., 2004), mais également dans la région CA1 de l'hippocampe de souris présentant un KO conditionnel du gène de *cbp* (Valor et al., 2011), et H2B a aussi été identifiée comme un substrat pour P300 et PCAF, mais pas pour Tip60 (Allis et al., 2007; Roth et al., 2001). Au niveau mécanistique, un papier récent décrit l'acétylation de H2B en réponse à une dépolarisation de tranches d'hippocampe *in vitro* (Maharana et al., 2010). Ceci est cohérent avec notre étude qui met en lumière l'implication des projections glutamatergiques, au moins en partie, dans le contrôle des acétylations de H2B et renforce leur rôle potentiel dans la formation de la mémoire. Nos expériences de ChIP ont montré un enrichissement de l'acétylation de H2B sur des promoteurs de gènes liés au fonctionnement de la mémoire (cf figure 2B), ainsi que sur le gène de *cbp* lui-même (figure 4C). Il a été montré récemment que certains de ces gènes sont régulés par HDAC2 et/ou HDAC3 qui sont des isoformes de HDAC associées à la régulation de la formation de la mémoire et de la

plasticité synaptique (Guan et al., 2009; McQuown et al., 2011). Il est intéressant de noter que parmi les 4 histones, seules les histones H2B et H4, mais pas H2A et H3, étaient hyperacétylées dans les extraits d'histones hippocampiques provenant des souris knock-out HDAC2, lesquelles montraient une augmentation du nombre de synapses et une amélioration de la mémoire (Guan et al., 2009). De même, les souris recevant un inhibiteur spécifique de HDAC3 présentaient une augmentation de l'acétylation sur la lysine 8 de l'histone H4 dans la région CA1 de l'hippocampe, associée à une amélioration de la mémoire à long terme (McQuown et al., 2011). Nos résultats montrent une régulation dynamique de l'acétylation de H2B/H4 durant la consolidation de la mémoire spatiale avec l'hypothèse intéressante qu'un code épigénétique particulier (modifications spécifiques d'histones) pourrait participer à la régulation de la consolidation de la mémoire à long terme (Sweatt, 2009; Graff and Mansuy, 2008).

B. Augmentation de l'expression des HAT et de la formation de la mémoire.

L'importance de l'activité HAT de CBP et des autres HAT tels que P300 et PCAF dans la formation de la mémoire à long terme est bien documenté (Barrett and Wood, 2008). Il semblerait même que CBP soit nécessaire non seulement dans la mémoire à long terme mais également dans la mémoire à court terme (Chen et al., 2010). Cependant, toutes les études ont été réalisées avec des souris transgéniques, et aucune ne s'est intéressée aux régulations dynamiques de ces HAT au cours de la formation de la mémoire dans l'hippocampe normal. Toutes ces HAT ont montré une augmentation de l'expression durant l'acquisition de la mémoire et une augmentation significative de l'activité HAT a été mesurée dans les extraits hippocampiques (cf figure 3). Il a été montré que les déficits de mémoire spatiale présents chez les souris conditionnelles exprimant une molécule de CBP ayant une fonction HAT déficiente, peuvent être neutralisés par un entraînement intensif (Korzus et al., 2004). Par ailleurs, les déficits de mémoire spatiale dus à des neurodégénérescences peuvent être réduits grâce à un enrichissement de l'environnement qui est corrélé avec une augmentation de l'acétylation des histones dans l'hippocampe (Fischer et al., 2007). Il est ainsi possible que certains signaux, co-activateur comme CBP, p300 et PCAF soient capables de se compenser dans l'apprentissage spatial. Nous avons trouvé étonnant que l'enzyme CBP ne soit pas induite sur le promoteur de certains gènes liés à la mémoire (tel que le *bdnf-pIV*), et CBP était

même diminuée sur le promoteur de zif268, alors que celui-ci présente clairement une augmentation des acétylations sur H2B (figure 2 et 4). Ces résultats suggèrent une interaction entre ces différentes HAT comme CBP, p300 et PCAF durant la formation de la mémoire, ce qui permettrait d'organiser la modulation de gènes spécifiques de la mémoire et de la plasticité nécessaire aux processus de mémorisation à long terme. Notamment, p300 joue un rôle critique dans la mémoire de reconnaissance à long terme, mais pas dans la formation de la mémoire spatiale (Oliveira et al., 2007), alors que les souris PCAF-KO ont des troubles de la mémoire à court et long terme, incluant la piscine de Morris (Maurice et al., 2008). Ainsi, le fait que les différentes HAT interfèrent réellement entre elles durant les processus de mémorisation (spatiale) reste une question ouverte qui pourra trouver des réponses avec le développement de nouveaux outils technique (par exemple des anticorps anti p300 et anti PCAF qui fonctionnent en ChIP) et des études dans d'autres situations expérimentales (investigation d'autres tâches mnésiques et à différents temps).

C. Répercussion des variations des niveaux de CBP sur les fonctions neuronales

Nous avons montré grâce à l'étude de la régulation des transcrits, de l'expression des protéines, à l'immunohistochimie couplée à des analyses semi quantitatives des densités optiques, que les niveaux dans l'hippocampe de CBP augmentaient pendant la consolidation d'une tâche mnésique. A notre connaissance, c'est le premier résultat décrivant une régulation physiologique de l'expression de CBP qui pourrait être lié à la formation de la mémoire. Jusqu'à maintenant, les augmentations de CBP ont été uniquement décrites dans des conditions pathologiques et notamment dans certaines formes de cancer (Comuzzi et al., 2004; Karamouzis et al., 2002).

En fait, la marge de régulation physiologique des niveaux de CBP ne peut correspondre qu'à des variations fines. En effet, une baisse des niveaux de CBP est délétère : un embryon de souris nullizygote pour CBP meurt à 10,5 jours de vie embryonnaire (Oike et al., 1999). Chez les humains, la mutation monoallélique du locus de CBP correspond au syndrome de Rubinstein-Taybi (Petrij et al., 1995). Dans les neurones matures, la perte protéique de CBP ou l'inactivation de son activité enzymatique semble être une marque de condition neurodégénérative (Rouaux et al., 2003; Rouaux et al., 2004; Saha and Pahan, 2006). Les dernières publications modèrent ce processus, en effet, les souris présentant un KO

conditionnel de cbp ne présentent pas de dégénérescence (Chen et al., 2010 ; Valor et al., 2011). Ainsi, CBP semble être indispensable dans la neuroprotection des neurones en développement (embryogénèse, neurones en culture...) mais à l'état adulte CBP n'apparaît plus être indispensable à la survie cellulaire. Malgré tout, les niveaux de CBP ont une marge de variabilité étroite dans les cellules (Vo and Goodman, 2001) et la perte de l'intégralité ou d'une partie de cette enzyme ou de son activité entraîne des troubles mnésiques (Alarcon et al., 2004 ; Korzus et al., 2004 ; Wood et al., 2005 ; Chen et al., 2010 ; Valor et al., 2011). Il est donc vraisemblable qu'une augmentation des quantités de CBP durant la formation de la mémoire augmentera les possibilités de liaisons de CBP à d'autres facteurs de transcription, entraînant un élargissement des profils d'expression à d'autres gènes cibles, probablement afin de contribuer à la consolidation de la trace mnésique (voir modèle de la figure 7). De plus, il se pourrait qu'au fur et à mesure la stabilité de CBP augmente, permettant avec le temps l'activation de gènes cibles. La présence d'un pic de BDNF 12h après un essai d'acquisition (*inhibitory avoidance*), est un exemple d'une activation moléculaire tardive nécessaire à la consolidation (Bekinschtein et al., 2007). Or sa régulation requiert la modulation des acétylations des histones (Bredy et al., 2007 ; Lubin et al., 2008).

Avec ce travail, nous avons montré que les voies dépendantes des acétylations des histones et de CBP, à tous les niveaux évalués (par exemple CBP et la transcription de gènes cibles, expression protéique, acétylation d'histone et enrichissement sur le promoteur) ne sont pas recrutées durant une tâche d'apprentissage suite à une dénervation des projections cholinergiques et glutamatergiques aboutissant sur l'hippocampe. Cela suggère un rôle actif de ces projections dans la régulation de l'activité HAT neuronale durant la formation de la mémoire. La combinaison de ces lésions entraîne une perte des fonctions mnésiques des rats et notamment de la mémoire équivalente à la mémoire déclarative chez l'homme et modélise les aspects d'une amnésie antérograde, tel que décrit chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Cassel et al., 2008; Traissard et al., 2007). Ainsi, la modulation des niveaux de CBP paraît intéressante dans les pathologies liées à la mémoire. La modulation pharmacologique des niveaux de CBP a été récemment étudiée (Saha et al., 2009) : un pré-conditionnement de neurones en grains du cervelet de rat en culture, avec du TNF-alpha les protégerait de conditions dégénératives (en particulier de la toxicité A β) grâce à une augmentation de l'expression de CBP dans les neurones. Les auteurs suggèrent qu'une quantité adéquate de CBP est requis au niveau basal afin d'assurer des fonctions pro-survie. Au laboratoire, il a été précédemment montré que CBP était un substrat de la caspase 6 (Rouaux et al., 2003), qui est une caspase qui est activée dans les neurones des patients

atteints de la MA ainsi que durant le vieillissement (Albrecht et al., 2009; Albrecht et al., 2007; Guo et al., 2004). Une étude récente *in vivo* a permis de montrer que l'administration de particules virales contenant CBP, dans l'hippocampe de souris triple transgéniques MA, permettait d'augmenter l'expression du Bdnf et restaurait les déficits d'apprentissage et de mémorisation de ces souris (Caccamo et al., 2010). Les auteurs ont montré dans cette étude que l'accumulation de peptides A β interférait avec l'activité CREB et par conséquent avec CBP. Une autre étude a permis de montrer un lien entre la toxicité des peptides A β et une autre HAT : la *p300/CBP binding protein associated factor*. En effet, il semblerait que PCAF régule l'expression des protéines impliquées dans la génération et la dégradation des peptides A β (Duclot et al., 2010). Ainsi, ces dernières études apportent de nouvelles informations sur le lien qu'il existe entre la toxicité β amyloïde retrouvée dans la MA et les HAT. Ici, nous avons montré que la formation de la mémoire est accompagnée par (et pourrait même requérir) une régulation dynamique des niveaux de CBP, ainsi que plusieurs autres HAT, dans l'hippocampe. Ces données montrent que les niveaux de CBP peuvent effectivement être modulés durant la vie par des signaux environnementaux (incluant la mémorisation à long terme).

Les dérégulations épigénétiques sont de plus en plus documentées dans les désordres cognitifs, incluant la MA (Graff and Mansuy, 2009; Choularias et al., 2010). Nous avons déterminé des marqueurs impliqués dans la mémorisation et ceux-ci sont profondément altérés par des dénervations de l'hippocampe mimant la MA. Ainsi, nos résultats peuvent avoir des répercussions thérapeutiques intéressantes (cf Perspectives thérapeutiques).

CHAPITRE 2

Article en préparation :

Étude de l'acétylation de l'histone H2B au cours d'un apprentissage spatial en piscine de Morris

Introduction

Des publications ont montré que les acétylations des histones sont induits par un entraînement mnésique suggérant leur implication dans la formation de la mémoire en facilitant l'expression des gènes (pour revue Sharma, 2010). Nous avons pu observer dans le premier chapitre (Bousiges et al., 2010) une augmentation de l'acétylation des histones H2B et H4 au moment de la consolidation de la mémoire à 3 jours d'entraînement en piscine de Morris. Cette hyperacétylation, notamment sur H2B, durant un apprentissage spatial, peut être fonctionnellement liée à l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la mémoire et la plasticité. Par ailleurs, l'acétylation de H3 apparaît réactive au contexte environnemental plutôt qu'au test d'apprentissage en lui-même. Cela suggère que l'acétylation de H2B pourrait représenter une marque épigénétique nécessaire à la formation de la mémoire à long terme. Ces modifications épigénétiques semblent liées à une augmentation de plusieurs HAT, incluant CBP, (au niveau de l'expression transcriptionnelle et protéique), ainsi qu'une augmentation de l'activité HAT dans l'hippocampe dorsal.

Actuellement, on ne connaît pas la cinétique d'acétylation des histones permettant la mise en place de la formation de la mémoire, et notamment au moment où celle-ci n'a pas encore été consolidée. En effet, la plupart des publications étudiant les mécanismes épigénétiques dans les processus de mémorisation à long terme présente des tâches d'apprentissage ponctuelles permettant une consolidation de la mémorisation mais qui ne nécessitent pas la répétition de la tâche, comme par exemple les conditionnements à la peur (i.e. Levenson et al., 2004 ; Chwang et al., 2006), ou les reconnaissances d'objets (i.e. Koshibu et al., 2009).

Dans le cas d'un entraînement en piscine de Morris, nous avons la possibilité d'étudier la force de la trace dans une tâche d'apprentissage spatial. Nous nous étions placés à 3 jours d'entraînement en piscine de Morris afin que les rats soient à un moment où les processus impliqués correspondent majoritairement à un mécanisme de consolidation de la mémoire spatiale (Bousiges et al., 2010).

L'objectif est de savoir au moment de la mise en place de la formation de la mémoire au bout d'un jour d'apprentissage, alors que les rats n'ont pas encore consolidé la localisation de la plateforme, quelles sont les modifications des acétylations des histones existant dans l'hippocampe de ces rats par rapport à des rats qui n'ont pas appris (rats *home cage* HC et rats ayant nagé vers une plateforme visible pendant un jour VPf J1), et des rats qui ont eu 3 jours d'apprentissage (plateforme cachée HPF J3).

Résultats

Formation de la mémoire spatiale durant une acquisition de 1 jour et 3 jours en piscine de Morris

Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions expérimentales que dans le chapitre 1 (Bousiges et al., 2010) afin de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la mémorisation à la suite d'un apprentissage d'un jour et trois jours en piscine de Morris. Ainsi, deux groupes de rats ont été entraînés pendant 2 périodes différentes (1 et 3 jours), selon le protocole décrit au chapitre 1. Chacun de ces 2 groupes sont eux-mêmes constitués d'un groupe de rats qui nage vers une plateforme cachée (HPf), d'un groupe de rats qui nage vers une plateforme visible (VPf, premier groupe contrôle), mais également d'un groupe de rats qui sont restés dans leur cage (*home cage* HC, deuxième groupe contrôle). En effet, nous avons ajouté ce groupe car nos résultats précédents observés à 3 jours d'apprentissage (Bousiges et al., 2010) ont montré que les acétylations des histones H3 ne variaient pas dans un contexte d'apprentissage spatial entre le groupe HPf et le groupe VPf, mais par contre elles semblaient dépendantes du contexte environnemental : variations entre un groupe de rats qui sont restés dans leur cage *home cage* HC et un groupe VPf. A noter, les rats HC subissent des manipulations de quelques minutes soit sur un jour pour ceux qui sont associés aux groupes nageant pendant un jour (HPf J1 et VPf J1) soit sur 3 jours consécutifs pour ceux qui sont associés aux groupes nageant pendant 3 jours (HPf J3 et VPf J3).

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de mémorisation dans l'hippocampe, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions protocolaires que précédemment : les rats qui ont nagé en piscine, ont 4 essais consécutifs par jour et tous les rats sont euthanasiés juste après avoir réalisé le test de rétention une heure après le dernier entraînement du jour 1 ou du jour 3. Le temps d'une heure après le dernier essai permet la transduction du signal et la mise en place des régulations transcriptionnelles. A noter, les rats sont euthanasiés moins de 45sec après le test de rétention (probe trial), minimisant ainsi l'impact moléculaire de ce dernier.

Il a été montré que le fait de retirer la plateforme après un entraînement en plateforme visible provoquait un stress très important chez ces rats. Ainsi, les rats nageant vers une plateforme visible, ne subissent pas de test de rétention, afin de ne pas ajouter un paramètre supplémentaire (un stress extrême) qui brouillerait nos résultats. Cependant, à la place de ce

test, ces animaux doivent nager vers une plateforme visible afin d'être dans les conditions expérimentales les plus proches des rats qui suivent l'apprentissage (HPf).

Les données comportementales sont présentées sur la figure 20A (acquisition pour 1 jour d'apprentissage), 20B (test de rétention pour 1 jour d'apprentissage), 20C (acquisition pour 3 jours d'apprentissage), 20D (rétention pour 3 jours d'apprentissage). Chez les rats qui ont suivi un jour d'apprentissage, l'analyse du test de rétention (probe trial) effectué une heure après le dernier essai, indique que la trace mnésique n'est pas encore établie (figure 20B). Un effet quadrant a pu être noté pendant le test de rétention ($F_{(3,20)} = 4,40$, $p < 0,05$) et le temps resté dans le quadrant SE est significativement en dessous de 15sec (correspondant au hasard, $t_{(5)} = -3,15$, $p < 0,05$). Lors de l'entraînement de 3 jours, les rats qui nagent vers une plateforme visible (VPf) parcourent chaque jour environ la même distance pour atteindre la plateforme, à l'exception du 3^{ème} jour où ils nagent plus directement vers la plateforme. Les rats qui apprennent (HPf) présentent une amélioration de la performance au fur et à mesure des jours d'entraînement (figure 20C). On peut noter que l'amélioration n'est pas significative, cependant le nombre de rats ($N=4$ par groupe) n'est probablement pas suffisant pour que les écarts relevés soient significativement différents. L'acquisition de la tâche dans le groupe HPf a été confirmée par le test de rétention une heure après le dernier entraînement, en effet la performance des rats était significativement supérieure à la chance dans le quadrant cible (Effet quadrant 2 way-Anova $F_{(3,12)} = 11,84$, $p < 0,001$; temps dans le quadrant cible versus 15sec : $t_{(3)} = 3,18$, $p < 0,05$).

Ces résultats sont en adéquation avec les précédents résultats comportementaux décrits dans le chapitre 1, à 3 jours d'apprentissage.

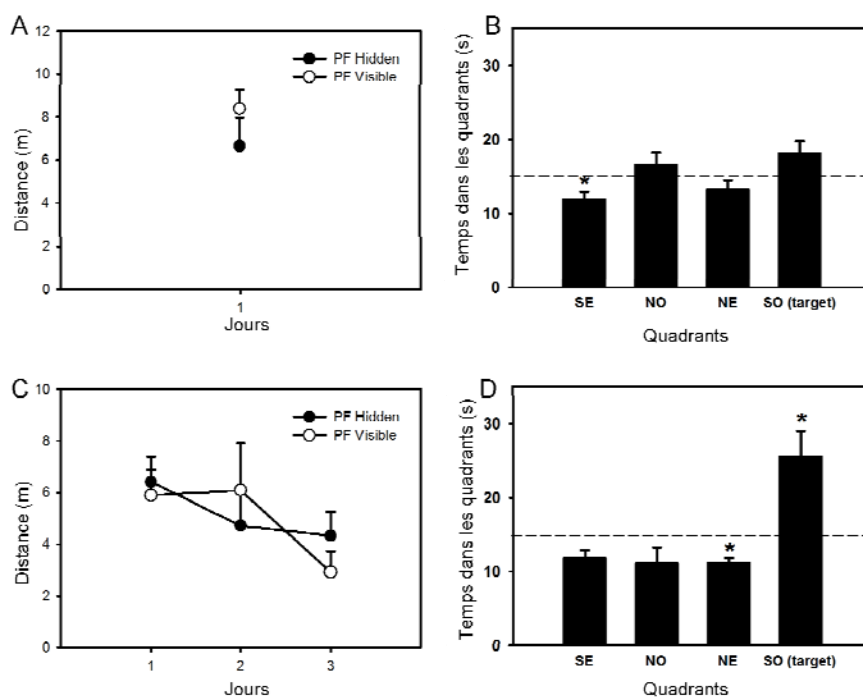


Figure 20 : Performance de rats entrainés sur un ou trois jours consécutifs (4 essais par jour) en piscine de Morris. Les rats contrôles ont nagé vers une plateforme visible (VPf) dont l'emplacement a été changé à chaque essai. Les rats qui suivent l'apprentissage doivent nager vers la plateforme cachée (HPf) qui est à une position fixe. Les données d'acquisition des rats ayant subi 1 jour (A) ou 3 jours (C) de piscine de Morris sont exprimées comme la moyenne des distances (+/- SEM) pour atteindre la plateforme. La performance au test de rétention pour les rats HPf, entrainés pendant un jour (B) ou 3 jours (D), est donnée comme le temps moyen où sont restés les rats dans le quadrant (+/- SEM) ; la performance était significativement au dessus du niveau chance (15 sec) uniquement dans le quadrant cible, alors que le temps dans les trois autres quadrants peut être soit au niveau de la chance soit significativement sous la chance. * $p < 0,05$, significativement différent de la chance. SE :sud est ; NO : nord ouest ; NE : nord est ; SO : sud ouest, correspondant à l'endroit où se trouvait la cible.

Le profil d'acétylation des histones est identique à un jour et à trois jours d'apprentissage

A 3 jours d'apprentissage, nous avons détecté une augmentation significative des niveaux d'acétylations des histones H2B (H2Btetra acétylés) chez les rats HPf comparés aux rats VPf et HC (1,34 fois, $p < 0,05$ entre VPf et HPf ; 1,67 fois, $p < 0,01$ entre HC et HPf, figure 21A gauche). Aucune variation significative de l'acétylation de l'histone H2B n'a été détectée entre HC et VPf. Les niveaux d'acétylation de l'histone H3 sont augmentés dans les groupes VPf et HPf par rapport aux HC (2,22 fois, $p < 0,001$ entre HC et VPf ; 2,3 fois, $p < 0,01$ entre HC et HPf, figure 21A droite). Ainsi, les résultats à 3 jours d'apprentissage sont cohérents avec les précédents résultats (Bousiges et al., 2010).

Nous avons noté une augmentation significative de l'acétylation de l'histone H2B dans le groupe qui a eu un jour d'apprentissage (HPf) par rapport aux groupes VPf et HC

(H2B tetra acétylés, 1,42 fois, $p < 0,05$ entre VPf et HPf ; 1,37 fois, $p < 0,05$ entre HC et HPf, figure 21B gauche). Par contre aucune variation d'acétylation de l'histone H2B n'a été observée entre les 2 groupes VPf et HC. Nous avons remarqué que l'acétylation de l'histone H3 était significativement augmenté dans les groupes VPf et HPf par rapport au groupe HC (H3 di-acétylée, 1,54 fois entre HC et VPf, $p < 0,001$; 1,49 fois entre HC et HPf, $p < 0,001$, figure 21B droite), mais aucune variation n'a été détectée entre les groupes VPf et HPf à un jour d'apprentissage.

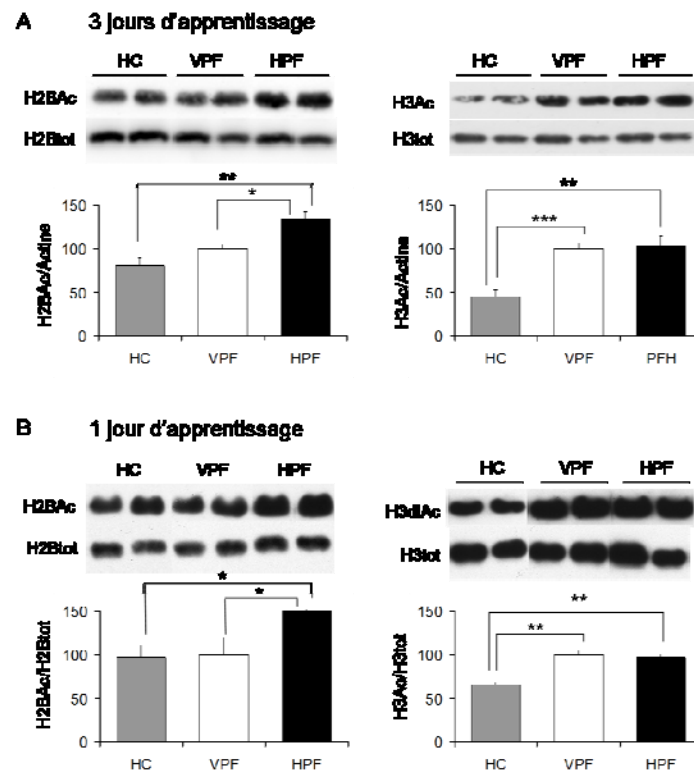


Figure 21 : Augmentations spécifiques des niveaux d'acétylation de H2B durant la formation de la mémoire spatiale et des niveaux d'acétylation de H3 de manière dépendante du contexte dans l'hippocampe de rat.

(A) Comparaisons des niveaux d'acétylation des histones entre des rats *home cage* (HC, N=4), des rats qui ont nagé vers une plateforme visible pendant 3 jour (VPf, N=4) et des rats qui ont nagé vers une plateforme cachée pendant 3 jour (HPf, N=4). (B) Comparaisons des niveaux d'acétylation des histones entre des rats *home cage* (HC, N=4), des rats qui ont nagé vers une plateforme visible pendant 1 jour (VPf, N=5) et des rats qui ont nagé vers une plateforme cachée pendant 1 jour (HPf, N=5). Les niveaux d'histones acétylés et l'actine ont été mesurés par western blot à partir d'extraits provenant d'hippocampe dorsal. Les acétylations ciblées par les anticorps sont H2BK5K12K15K20, et H3K9K14. Les *western blots* typiques sont présentés en duplicat. Les ratios correspondant aux rats nageant vers une plateforme visible (VPf) ont été arbitrairement été mis à 100%. Test t de student : *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,005$.

En conclusion, nous montrons que les profils d'acétylations des histones H2B et H3 sont identiques à 1 jour et 3 jours entre les 3 groupes (HC, VPf, HPf). Pour l'histone H2B, les variations d'acétylation à un jour d'apprentissage se produisent dans les mêmes proportions qu'à trois jours d'apprentissage en piscine de Morris (1,34 fois à 3 jours versus 1,42 fois à 1

jour entre HPf et VPf). Cependant pour l'acétylation de l'histone H3, on peut noter une progression entre un jour et trois jours (2,22 fois à 3 jours versus 1,54 fois à 1 jour entre VPf et HC).

Discussion

Les résultats obtenus à 3 jours d'apprentissage, ont confirmé ce que nous avons précédemment montré, à savoir que les acétylations des histones H3 ne variaient pas entre des rats nageant vers une plateforme visible (VPf) et des rats apprenant la localisation d'une plateforme cachée (HPf), mais les formes acétylées des histones H2B étaient significativement augmentées dans l'hippocampe dorsal de ces 2 groupes de rat. Nous avons pu découvrir, ensuite, que l'histone H2B était déjà hyperacétylée dans un contexte d'apprentissage (HPf versus VPf) dès le premier jour en piscine de Morris. Cependant, aucune variation d'acétylation de l'histone H3 n'a été décelée entre ces 2 groupes. Les acétylations des histones H3 étaient par contre, augmentées de manière importante, après un jour et trois jours d'entraînement dans les deux versions de la piscine de Morris (HPf et VPf) par rapport aux contrôles non entraînés (*home cage* HC). Ainsi, les profils d'acétylations de H2B et de H3 à 1 jour et 3 jours d'apprentissage sont similaires.

Cependant nous avons pu noter dans le chapitre 1 que l'étude de l'expression des HAT par RT-qPCR a permis de montrer qu'au bout d'un jour d'apprentissage, il n'y avait pas de variation significative de l'expression transcriptionnelle de CBP, p300 et PCAF dans l'hippocampe dorsal entre les 2 groupes (HPf et VPf). On peut supposer que l'augmentation des acétylations observée à la suite des 4 essais en piscine de Morris, est due à une activation des HAT présentes ; mais ces acétylations des histones détectées à 1 jour d'apprentissage ne sont à ce moment, pas suffisantes pour permettre la transcription de ces HAT.

Ces résultats peuvent laisser supposer que les modifications d'acétylations observées à 3 jours ne soient pas représentatives de l'accumulation des événements moléculaires sur les 3 jours d'apprentissage, mais plutôt du processus moléculaire qui suit, une heure après les 4 essais, quelque soit le nombre de jour d'apprentissage qui précède. On peut cependant imaginer qu'il existe des différences d'acétylations entre 1 jour et 3 jours d'apprentissage en piscine de Morris. Par exemple, il est possible qu'il y ait la mise en place d'autres modifications épigénétiques (comme la phosphorylation des histones, cf Chwang et al., 2006, ou la méthylation des histones, cf Gupta et al., 2010). Pour l'acétylation de H2B, on peut imaginer qu'il y ait un maintien dans le temps des acétylations qui soit plus long à 3 jours

qu'à 1 jour d'apprentissage, ce qui permettrait le maintien transcriptionnel de gènes nécessaires à la mémorisation. Enfin, il est probable d'avoir une hyperacétylation de H2B au niveau de gènes différents entre 1 et 3 jours, qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la quantité de CBP à 3 jours. En effet, cette augmentation de CBP entrainerait un recrutement de nouveaux facteurs de transcription conduisant à un élargissement des profils d'expression à d'autres gènes cibles, probablement afin de contribuer à la consolidation de la trace mnésique (cf Bousiges et al., 2010, figure 7). Il faut noter que ces hypothèses ne sont pas exclusives, en effet, ces événements peuvent se réaliser indépendamment les uns des autres.

Cependant, on peut penser que cette hyperacétylation de l'histone H2B va permettre la transcription de gènes impliqués dans la formation de la mémoire et cela dès le premier jour d'apprentissage. L'étude des profils d'expression des gènes à 1 jour et 3 jours d'apprentissage permettrait de connaître si ce sont les mêmes transcrits ou des transcrits différents entre ces 2 temps d'apprentissage. La transcription de gènes aussi précocement peut paraître étonnante car au bout d'un jour d'apprentissage les rats ne sont pas capables de se souvenir de la localisation de la plateforme, ils n'ont pas consolidé la tâche d'apprentissage. La mémoire à court terme ne nécessitant pas de transcription et de traduction des ARNm nouvellement formés en protéines, on peut imaginer que cette activation transcriptionnelle va être impliquée par exemple dans la mise en place de la potentialisation à long terme et ainsi servir lors des répétitions de la tâche les jours suivant afin de consolider la localisation de la plateforme dans leur mémoire à long terme. Au fur et à mesure de la répétition de la tâche cela permettrait d'augmenter les quantités des protéines ou peut être de synthétiser de nouvelles protéines capables d'agir sur la plasticité synaptique (remaniement synaptique, formations d'épines dendritiques...) permettant la consolidation de la tâche dans la mémoire à long terme (revue Hofer and Bonhoeffer, 2010). Certaines études ont montré que les inhibiteurs de HDAC (cf « Perspectives thérapeutiques ») étaient capables de transformer un stimulus ne permettant seulement qu'une mémorisation à court terme ou la mise en place d'une E-LTP, en processus de mémorisation à long terme ou à la mise en place d'une L-LTP (Stefanko et al., 2009 ; Vecsey et al., 2007). On peut penser que, comme dans nos conditions à un jour d'apprentissage, dans ces expérimentations, les stimuli étaient capables de mettre en place des mécanismes d'acétylations permettant une activation transcriptionnelle, qui seraient renforcés par l'inhibition des HDAC conduisant à une activation transcriptionnelle plus importante ou différente de l'initiale, susceptible de faciliter le passage de la mémoire à court terme vers la mémoire à long terme.

En conclusion, nous avons pu montrer que les profils d'acétylation de H2B et H3 en piscine de Morris sont relativement similaires entre 1 jour et 3 jours d'apprentissage. Ainsi, il existe un engagement précoce de l'acétylation de H2B dans ces processus de mémorisation. Ces résultats ouvrent sur plusieurs questions. Nous avons démontré les variations des acétylations de l'histone H2B dans un contexte de mémoire spatiale, il serait intéressant de savoir si l'on retrouve des variations d'acétylation de cette histone dans d'autres tâches d'apprentissage comme par exemple en conditionnement à la peur. Cela permettrait de savoir si l'augmentation de l'acétylation de H2B dans un contexte d'apprentissage est spécifique ou non de la mémoire spatiale. D'autre part, afin de déterminer l'hypothèse d'une hyperacétylation de H2B au niveau de gènes différents entre 1 et 3 jours, qui se traduirait par la transcription de gènes différents, il serait intéressant d'effectuer des *microarrays* en comparant l'expression transcriptionnelle d'un ensemble de gènes cibles entre 1 jour et 3 jours d'apprentissage. Dans l'objectif, d'étudier l'efficacité des modulateurs d'acétylation des histones (inhibiteurs de HDAC, activateurs de HAT), il pourrait être intéressant de savoir si un traitement avec l'une de ces molécules permet la formation de la mémoire à long terme des animaux qui n'ont suivi qu'un jour d'apprentissage en piscine de Morris. Enfin, dans le chapitre qui suit (chapitre 3) nous avons tenté de déterminer comment était modulé ces acétylations en réponse à une activation glutamatergique dans un modèle cellulaire.

CHAPITRE 3

Expérimentations préliminaires:

La stimulation des récepteurs NMDA provoque une activation différentielle des acétylations des histones H3 et H2B dans des cultures primaires de neurones

Introduction

Il semblerait qu'une tâche faisant intervenir la mémoire à long terme ou un stimulus qui permet de provoquer une activation transcriptionnelle, soit capable de favoriser des modifications d'acétylations sur certains types d'histones. Comme nous avons pu le voir en introduction, il a été décrit que CBP était impliqué dans les processus de mémorisation à long terme (Barrett and Wood, 2008; Hallam and Bourtchouladze, 2006), or l'inactivation de CBP chez des souris diminue l'ensemble des acétylations de H2B (Alarcon et al., 2004 ; Chen et al., 2010 ; Valor et al., 2011), et empêche l'induction de la transcription dépendante de la L-LTP sans altérer la E-LTP (Alarcon et al., 2004). Le traitement de tranches d'hippocampe prélevées chez ces souris avec un inhibiteur de HDAC (HDACi) comme le SAHA permet de restaurer les niveaux d'acétylation de l'histone H2B et d'améliorer la L-LTP (Alarcon et al., 2004). Ainsi, un stimulus permettant la mise en place d'une L-LTP, semble dépendant des niveaux d'acétylations de l'histone H2B. De même, un effet similaire est observé chez des rats, chez lesquels on a administré des HDACi (TSA, butyrate de sodium) et qui ont présenté une augmentation de l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Levenson et al., 2004), suggérant un lien causal entre l'acétylation des histones et la LTP. De plus, comme dans l'hippocampe, l'administration de TSA augmente aussi la LTP dans l'amygdale (Yeh et al., 2004). L'administration de HDACi peut sembler peu spécifique, pourtant ils n'altèrent pas l'intégralité de l'épigénome (Vecsey et al., 2007). En effet, quand la TSA est appliquée sur des tranches d'hippocampe d'animaux soumis à un conditionnement à la peur, seul, un sous-ensemble de gènes présentant un CRE ont leur transcription augmentée (Vecsey et al., 2007). Ces résultats montrent l'existence de mécanismes épigénétiques spécifiques de la régulation des gènes qui peuvent être modulés par des stimuli environnementaux différents, une observation évocatrice de l'existence d'un code histone.

De plus, nous avons vu dans le premier chapitre (Bousiges et al., 2010), *in vivo* chez le rat, qu'en fonction de la tâche, les acétylations ne sont pas augmentées sur les mêmes histones. En effet, lors d'une tâche d'apprentissage spatiale en piscine de Morris, les rats consolidant la localisation d'une plateforme par rapport à des rats nageant vers une plateforme visible (donc n'apprenant pas), vont présenter une augmentation des acétylations des histones H2B et H4, mais pas des histones H3 au niveau de leur hippocampe dorsal. A contrario, les rats ayant nagé trois jours vers une plateforme visible ou une plateforme cachée, par rapport à des rats étant restés dans leur cage, vont présenter une augmentation de l'acétylation des

histones H3 dans l'hippocampe dorsal, mais pas des autres histones. Nous en avons conclu que l'acétylation de l'histone H2B pouvait représenter un marqueur épigénétique de la mémoire à long terme pour l'information spatiale et que l'acétylation de l'histone H3 apparaissait réactive au contexte environnemental plutôt qu'au test d'apprentissage en lui-même.

L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse que les processus mnésiques recrutent des mécanismes complexes de régulation épigénétique des gènes qui sont différents en fonction de la tâche.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les mécanismes impliqués dans la formation de la mémorisation, tels que la LTP, dépendent pour part d'une activation glutamatergique. Nos résultats comportementaux obtenus dans le modèle lésionnel ont montré que la destruction des voies glutamatergique et cholinergique afférentes à l'hippocampe, ne permettait pas l'instauration des mécanismes épigénétiques dépendant de CBP et de l'acétylation de H2B/H3 dans un contexte d'apprentissage.

Ainsi, il nous a semblé intéressant d'approfondir l'effet d'une activation de la voie glutamatergique via les récepteurs NMDA sur la dynamique des acétylations des histones et sur la transcription des gènes qui en résulte.

In vivo, de nombreuses études ont montré que l'activation des récepteurs NMDA permettait la mise en place d'un programme transcriptionnel impliqué dans la mémorisation et la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Ce programme transcriptionnel est associé à différentes modifications épigénétiques, tels que les augmentations de l'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 14 et de la phosphorylation de la serine 10 de l'histone H3 (Levenson et al., 2004 ; Chwang et al., 2006 ; Reul et al., 2009 ; Levenson and Sweatt, 2006 ; Crosio et al., 2003 ; Chandramohan et al., 2007 ; Reul and Chandramohan, 2007). *In vitro*, peu d'étude ont été réalisées afin d'approfondir l'action du NMDA sur l'acétylation des histones. Par exemple, Tian et collaborateurs ont montré qu'un traitement de 45min à 50µM de NMDA sur une culture de neurones hippocampiques de rats entraîne une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 14 du promoteur 1 du BDNF (Tian et al., 2009).

Aucune étude ne s'est intéressée à la cinétique d'acétylation globale des histones H3 et surtout des histones H2B, liée à l'activation des récepteurs glutamatergiques. Nous avons étudié ces mécanismes dans un modèle cellulaire suite à un traitement NMDA. Pour cela un modèle de neurones en culture primaire a été choisi. Nous avons souhaité travailler sur une

population homogène de neurones afin d'éviter, suite à un traitement NMDA, une accumulation de signaux provenant de population cellulaire différente. L'homogénéité des cellules va permettre d'avoir une homogénéité des signaux agissant sur l'acétylation des histones. Nous avons donc choisi d'effectuer des cultures primaires de neurones en grains de cervelet (CGN *cerebellar granule neurons*) (Kramer and Minichiello, 2010). De plus les neurones présents dans une culture de CGN *in vitro*, développent des caractéristiques de CGN matures que l'on retrouve *in vivo*, telles que l'expression de récepteurs au glutamate, ainsi que la production et la libération de glutamate (Kramer and Minichiello, 2010).

Nous avons étudié la cinétique d'action du NMDA sur les acétylations des histones, ainsi que l'effet dose du NMDA sur ces modifications épigénétiques. Nous avons voulu par la suite corrélérer les variations des modifications épigénétiques observées en fonction de la dose de NMDA à des différences dans l'expression de certains gènes.

Remarque : Les résultats présentés ci-joint correspondent à des expérimentations préliminaires. Ces expériences devront être répétées avec un nombre d'échantillons plus grand.

Matériel et méthodes

Culture primaire de neurones en grains du cervelet (CGN)

La culture de CGN est obtenue par dissociation de cervelet de souriceaux (SWISS) âgés de sept jours. La culture est réalisée dans une solution commerciale appelée Neurobasal à laquelle on ajoute du Glutamax (L-glutamine), du B27, ainsi qu'un antibiotique (gentamycine 50µg/mL) afin d'éviter toute contamination bactérienne. Les cervelets sont soumis à une dissociation enzymatique (trypsine), suivie d'une dissociation mécanique à l'aide d'une pipette. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des boîtes préalablement traitées à la L-polyornithine (0,1mg/mL), une nuit à 37°C. Afin de limiter les contaminations et d'apporter les nutriments nécessaire à la survie neuronale, le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures. Les neurones se différencient ainsi pendant 5 jours à 37°C sous atmosphère humidifiée (5% CO₂/95% air) pour donner une population neuronale homogène.

Traitements de la culture au NMDA

Les traitements ont été préparés dans le même milieu que celui utilisé pour la culture (Neurobasal + Glutamax + B27 + antibiotique) aux doses de 50 et 150µM de NMDA. Les

solutions contenant les traitements ont été ajoutées à la culture pendant 1, 4 et 8h. A la fin du temps de traitement, la culture est lavée au PBS froid, puis on ajoute soit une solution de *Laemmli buffer* 1X dans le but d'étudier les protéines soit du Trizol[®] afin de pouvoir extraire les ARN de la culture.

Western blot

La préparation des extraits totaux de protéines pour le western blot, ainsi que l'analyse du western blot sont décrites dans le chapitre 1.

RT-PCR en temps réel (Real time reverse transcription-PCR)

La technique de RT-PCR en temps réel utilisée est identique à la description faite dans le chapitre 1.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test t de student ou une *one-way ANOVA*. Quand cela était approprié, les comparaisons post-hoc ont été analysées avec un test de Newman-Keuls. Les valeurs ayant $p < 0,05$ sont considérés comme significatives.

Résultats

1) Une dose de 50 μ M de NMDA active différenciellement les acétylations des histones au cours du temps

Nous avons déterminé l'évolution des acétylations des histones H2B et H3 au cours du temps (trois temps) avec une dose modéré de NMDA, qui pourrait correspondre à une dose « physiologique », par rapport à une dose plus élevée qui pourrait être cytotoxique (figure 22). Nous avons noté qu'au bout d'1h de traitement, on avait une augmentation significative de l'acétylation de l'histone H3 (+52%, $p=0,05$) avec dans le même temps une baisse significative de l'acétylation de l'histone H2B (-30%, $p=0,04$). A 4h de traitement, alors que les acétylations des histones H3 sont revenues à leur niveau basal, les acétylations des histones H2B sont fortement augmentées (+96%, $p=0,015$). Au bout de 8h, les acétylations sur H3 et H2B sont au même niveau que les contrôles n'ayant pas reçu de NMDA.

Ces résultats montrent qu'après un traitement de NMDA 50 μ M les variations des acétylations des histones H3 et H2B sont différentes à un temps donné. Ainsi, la dynamique d'acétylation entre ces 2 histones n'est pas la même.

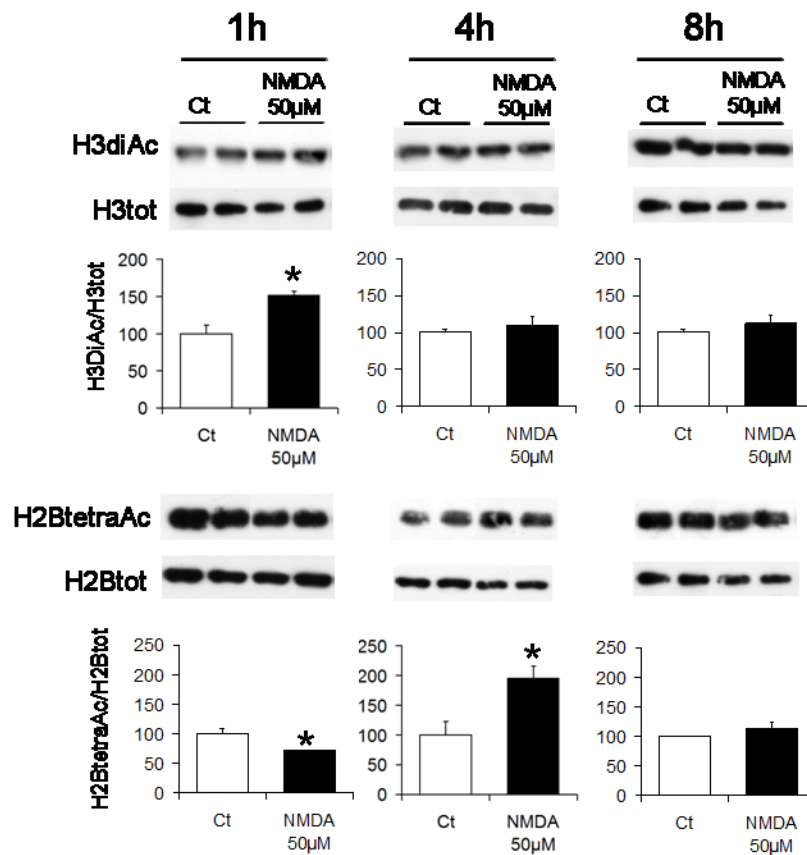


Figure 22: Cinétique d'acétylations des histones H3 et H2B de CGN suite à un traitement de NMDA 50 μ M

Expression des histones acétylées et totales. Les niveaux ont été évalués par western blot dans des extraits totaux de culture primaire de CGN (DIV 5 jours). 2 groupes sont comparés : ct vs NMDA 50 μ M à 3 temps différents (1h, 4h, 8h). Les blots ont été quantifiés (n=2 par groupe) et les histones acétylées ont été normalisées par rapport à leur histone totale. Le rapport de la quantification des histones acétylées sur les histones totales des contrôles (Ct) a été mis arbitrairement à 100. * p<0,05 par rapport au groupe contrôle.

2) Effet dose du NMDA sur l'acétylation des histones

Un traitement à 50 μ M de NMDA entraîne une cinétique d'acétylations des histones différente entre les histones H3 et H2B. Nous avons évalué, dans un deuxième temps, l'effet de la dose de NMDA sur la dynamique des acétylations des histones H3 et H2B. Nous nous sommes intéressés à cette dynamique pour une dose de 150 μ M de NMDA (figure 23). Il faut remarquer que cette dose n'est pas cytotoxique dans les CGN. Nous avons ainsi pu comparer l'effet d'un traitement NMDA 50 μ M par rapport à un traitement 150 μ M sur une culture de CGN (figure 24).

Nous avons observé un pic important de l'acétylation de l'histone H3 à 1h de traitement de NMDA à 150 μ M (+134%, $p=0,0079$ par rapport aux contrôles) (figure 23). A 4h et à 8h de traitement, il semblerait que les doses de NMDA n'aient plus d'effet sur l'acétylation de l'histone H3, les acétylations sont revenues à un niveau basal.

Les niveaux d'acétylations des histones H2B présentent, quant à eux, une baisse significative (-40%, $p=0,04$) à 1h de traitement NMDA 150 μ M. A 4h de traitement les acétylations de H2B ne sont pas significativement augmentées et à 8h de traitement les niveaux d'acétylations sont identiques aux contrôles (figure 23).

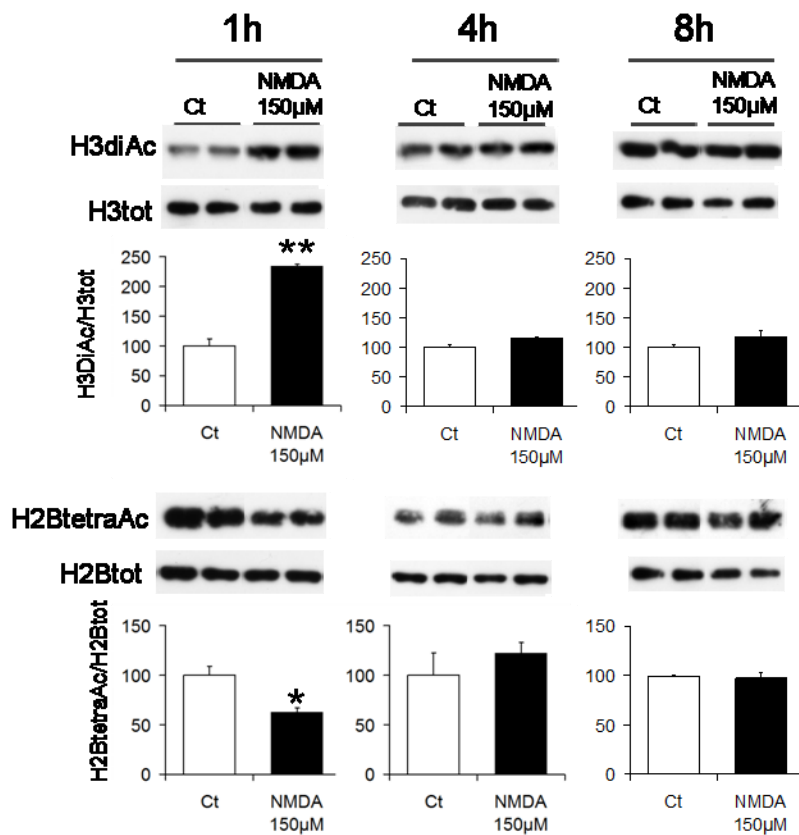


Figure 23: Cinétique d'acétylations des histones H3 et H2B d'une culture primaire de CGN suite à un traitement de NMDA 150 μ M.

Les niveaux d'histones acétylées et totales sont mesurés par western blot dans des extraits totaux de culture primaire de CGN (DIV 5 jours). 2 groupes sont comparés (Ct et 150 μ M de NMDA) à 3 temps différents. Les blots ont été quantifiés ($n=2$ par groupe) et les histones acétylées ont été normalisées par rapport à leur histone totale. Le rapport de la quantification des histones acétylées sur les histones totales des contrôles (Ct) a été mis arbitrairement à 100. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ par rapport au groupe contrôle.

La figure 24 récapitule les cinétiques d'acétylations des histones H2B et H3 dans les CGN suite à un traitement de 50 et 150 μ M de NMDA.

Comme dans le traitement à 50 μ M de NMDA, on retrouve, dans le traitement à 150 μ M de NMDA une différence de cinétique entre l'acétylation de l'histone H3 et l'acétylation de l'histone H2B, mais cette fois H2B n'est pas acétylée (figure 24).

L'histone H3 présente le même profil d'acétylations à 50 et 150 μ M de NMDA avec un pic d'acétylations à 1 heure puis un retour au niveau basal. Cependant, on peut noter un effet dose, avec une hyperacétylation plus importante à 1h pour un traitement à 150 μ M de NMDA par rapport à 50 μ M de NMDA (+134% pour 150 μ M versus +52% pour 50 μ M) (figure 24).

On peut noter un point intéressant sur la cinétique d'acétylations de l'histone H2B à 150 μ M de NMDA. En effet, on retrouve bien à 1h une baisse de l'acétylation (-40% pour NMDA 150 μ M contre -30% pour NMDA 50 μ M), mais pas d'augmentation à 4h comme nous pouvons l'observer avec le traitement de NMDA 50 μ M.

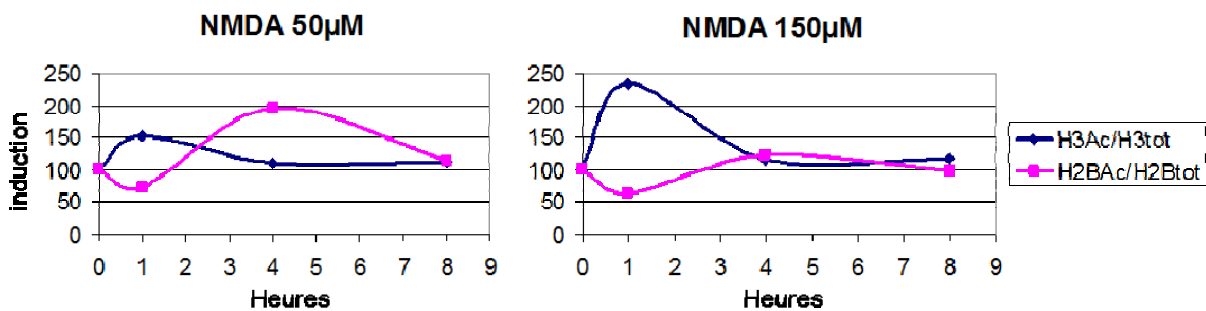


Figure 24: Bilan de la cinétique des acétylations des histones H3 et H2B en fonction d'un traitement de 50 et 150 μ M de NMDA sur une culture primaire de neurones en grains du cervelet (CGN).

Ainsi, on peut imaginer qu'à 4h de traitement, le pic d'acétylation de H2B à 50 μ M de NMDA, puisse entraîner une activation transcriptionnelle de gènes qui ne seront pas transcrits avec le traitement de NMDA 150 μ M ou encore permettre le maintien transcriptionnel de certains gènes. C'est pourquoi, nous avons étudié, par la suite, la transcription de différents gènes au delà de ces 4 heures de traitement de NMDA 50 et 150 μ M, afin de mettre en évidence une transcription qui pourrait rendre compte de cette activation différentielle des acétylations.

3) Cinétique et effet dose du NMDA sur un marquage épigénétique différent

La tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me3) est de manière générale corrélée à une activation transcriptionnelle, elle est caractéristique de l'euchromatine (Martin and Zhang, 2005 ; Karlic et al., 2010). De plus Gupta et collaborateurs ont récemment

démontré que la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 était indispensable pour les processus de mémorisation (Gupta et al., 2010). C'est pourquoi nous avons voulu étudier les cinétiques de cette modification aux 2 doses de NMDA (figure 25). La tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 est augmentée à 1h de manière significative suite à un traitement de 50 μ M de NMDA (+100% par rapport aux contrôles, $p < 0,05$). Le traitement 150 μ M de NMDA conduit également à une forte tendance à l'augmentation des méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, mais de manière non significative (+60% par rapport aux contrôles) (figure 25A). A 4h de traitement la dose de NMDA 150 μ M entraîne une augmentation un peu plus importante de la tri-méthylation de H3K4 que la dose de 50 μ M de NMDA, mais les 2 doses présentent une augmentation significative de la tri-méthylation de l'histone H3 (+111% pour 50 μ M et +148% pour 150 μ M) (figure 25A). A 8h de traitement, on peut noter une tendance à la baisse (de l'ordre de 25%) de la tri-méthylation à la dose de 50 μ M et pour 150 μ M de NMDA la tri-méthylation est revenue au niveau du contrôle (figure 25A). En conclusion, malgré un léger décalage dans ces 2 cinétiques, on peut noter que de manière générale elles sont relativement similaires (figure 25B), suggérant ici que des régulations transcriptionnelles similaires sont opérés sur les gènes dépendant de H3K4me3 par les deux doses de NMDA. Ces résultats renforcent l'idée d'une régulation transcriptionnelle différentielle opérée sur les gènes dépendant de H2B et H3 acétylées en réponse aux deux doses de NMDA.

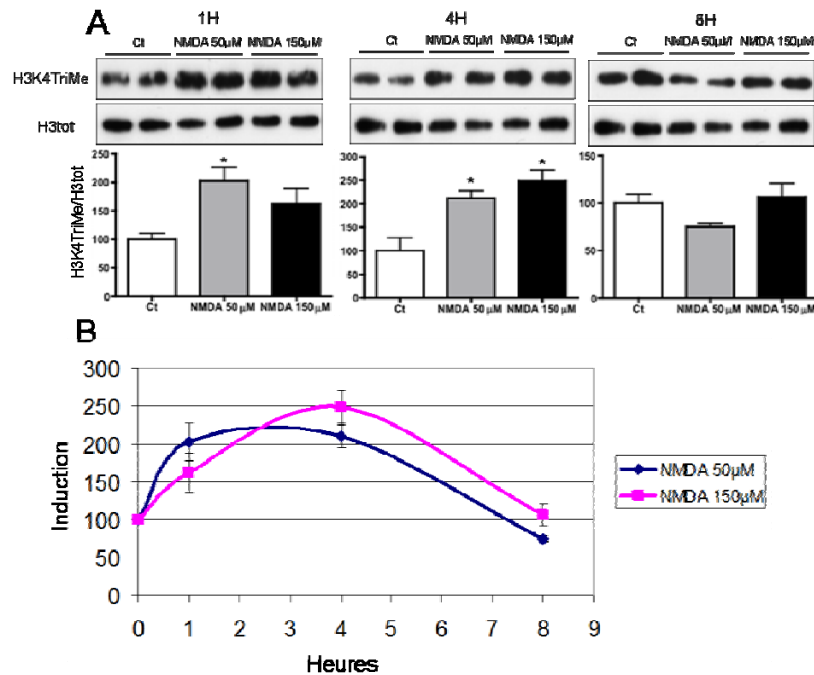


Figure 25: Effet dose du NMDA 50 et 150µM à 1h, 4h et 8h de traitement sur la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3.

(A) Les niveaux d'histones H3K4 tri-méthylées sont mesurés par western blot dans des extraits totaux de culture primaire de CGN. 3 groupes sont comparés (Ct, NMDA 50µM et 150µM) à 3 temps différents. Les blots ont été quantifiés (n=2 par groupe) et les histones acétylées ont été normalisées par rapport à leur histone totale. Le rapport de la quantification des histones acétylées sur les histones totales des contrôles (Ct) a été mis arbitrairement à 100. * p<0,05, par rapport au groupe contrôle. (B) Le graphique permet de comparer la cinétique de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 entre un traitement de NMDA 50µM et un traitement de NMDA 150µM.

4) Etude de la répercussion au niveau transcriptionnel à 6 heures, des traitements NMDA 50 et 150µM.

Afin de comprendre si l'activation différentielle des acétylations des histones H3 et H2B par les 2 doses de NMDA se traduit par la mise en place d'un programme génétique différent (ie permettant alors la mise en place d'effets physiologiques potentiellement différents), nous avons dosé l'expression de certains gènes de plasticité synaptique. En effet, nous avons observé à 4 heures de traitement, un pic d'acétylation de l'histone H2B à 50µM mais pas à 150µM de NMDA. Afin de connaître la répercussion de ce pic sur des éventuels processus transcriptionnels nous nous sommes placés arbitrairement 2 heures après le pic d'acétylation (soit 6h de traitement), pour mesurer la transcription des gènes suite à cette induction d'acétylation.

Régulation des gènes de plasticité neuronale à 6 heures de traitement de NMDA 50 et 150µM

Dans un premier temps, nous avons ciblé des gènes précoces impliqués dans la plasticité synaptique et/ou la mémorisation et qui ont montré qu'ils étaient activable via les

récepteurs NMDA, tels que cFos, Zif268 (Hughes and Dragunow, 1995) ou encore le BDNF via son promoteur I et IV (Lu et al., 2008 ; Tian et al., 2009). De plus, ces gènes ont été testés dans nos conditions d'apprentissage et sont sous le contrôle de H2B acétylée (cf chapitre 1, Bousiges et al., 2010).

Les résultats des RT-qPCR sont présentés en figure 26. Nous avons pu noter que les ARNm du Bdnf total présentaient une tendance à l'augmentation à 50 μ M (1,57 fois par rapport aux contrôles) et une augmentation significative à 150 μ M (3,2 fois par rapport aux contrôles, $p=0,02$). L'analyse des ARNm du Bdnf par l'intermédiaire de son exon I montre une augmentation significative de sa transcription à 50 μ M (2 fois par rapport aux contrôles, $p=0,03$) et à 150 μ M (4,37 fois par rapport aux contrôles, $p=0,0036$). L'expression du Bdnf via son exon IV présente une tendance à l'augmentation à 50 μ M de NMDA (1,35 fois par rapport aux contrôles) et une augmentation significative à 150 μ M de NMDA (2,17 fois par rapport aux contrôles, $p=0,012$). L'analyse de l'expression des gènes précoces régulateurs a montré pour Zif268 une augmentation significative de la transcription à 50 μ M (1,89 fois par rapport aux contrôles, $p=0,04$) et 150 μ M de NMDA (4,1 fois par rapport aux contrôles, $p=0,002$) et pour cFos une tendance à l'augmentation avec un traitement à 50 μ M de NMDA (1,58 fois par rapport aux contrôles) et une augmentation significative à 150 μ M de NMDA (3,53 fois par rapport aux contrôles, $p=0,036$).

On peut souligner que pour chaque gène, le MK801 antagonise correctement les deux doses de NMDA (50 et 150 μ M), en effet les niveaux d'ARNm ne sont pas augmentés en présence de l'antagoniste des récepteurs NMDA. Il est également intéressant de noter que le MK801 seul entraîne une baisse (non significative) sur l'ensemble de la transcription de ces gènes (Bdnf total, -33% ; Bdnf-EI, -40% ; Bdnf-EIV, -21% ; Zif268, -57% ; cFos, -58%). Ce résultat suggère que le glutamate libéré par les CGN en condition basal (décrit dans la revue Kramer and Minichiello, 2010) agit sur la transcription basale de ces gènes.

Remarque : ces expérimentations seront à répéter afin de confirmer ces résultats.

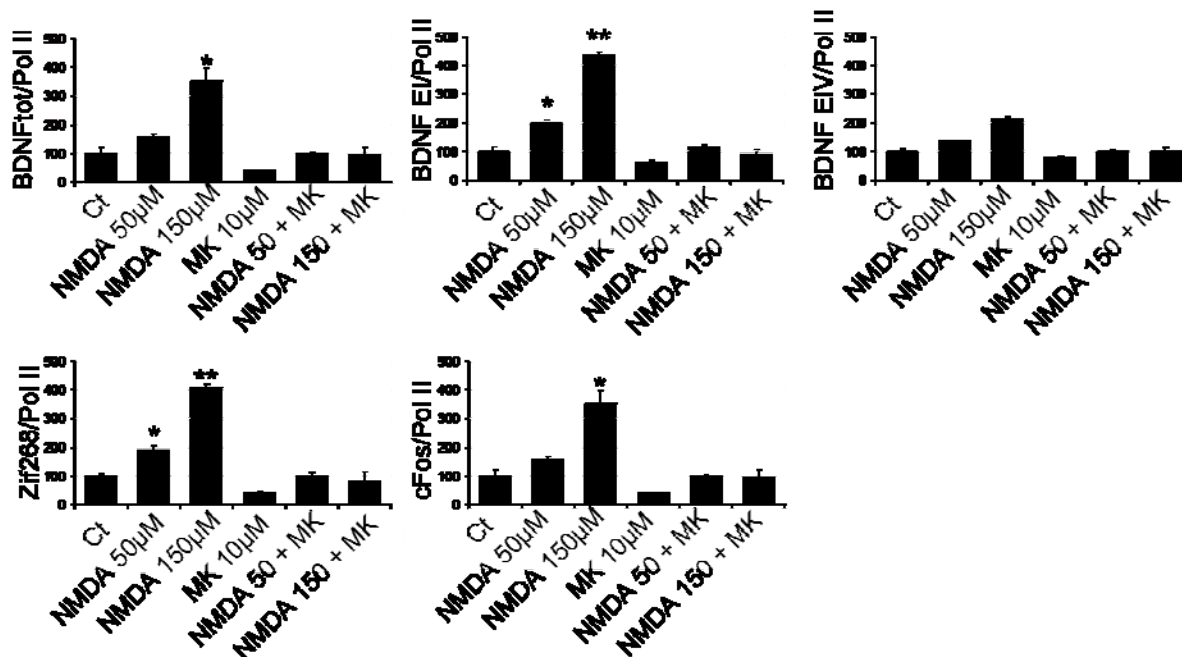


Figure 26 : Niveaux d'expression des ARNm de plusieurs gènes suite à un traitement de NMDA 50 ou 150µM durant 6h.

Les niveaux d'expression des ARNm du Bdnf total, Bdnf-EI, Bdnf-EIV, Zif268 et cFos ont été évalués par RT-qPCR dans une culture de CGN (DIV 5 jours) en situation contrôlée (sans traitement), avec un traitement de 50µM de NMDA ou avec un traitement de 150µM de NMDA pendant 6h. Les valeurs ont été normalisées avec la Pol II. La représentation correspond à la moyenne des résultats (+/-SEM) (N=2 par groupe). Les contrôles ont été arbitrairement normalisés à 100. One-way ANOVA : * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001 par rapport aux contrôles. Ct: contrôle sans traitement ; MK : MK801 antagoniste des récepteurs NMDA

Régulation d'un gène impliqué dans la voie pro-apoptotique : *forkhead box protein O 1* (*Foxo1*)

Il a été démontré que le glutamate se fixe non seulement sur ses récepteurs synaptiques mais également, en cas d'augmentation de la quantité libérée dans la fente synaptique, se fixe sur ses récepteurs extrasynaptiques entraînant l'activation d'une voie différente avec des effets opposés ; l'activation des récepteurs synaptiques est neuroprotectrice, alors que l'activation des récepteurs extrasynaptiques est apoptotique (Hardingham and Bading, 2010). On peut noter que ces récepteurs NMDA extrasynaptiques ont été décrits dans différentes populations neuronales dont les neurones en grains du cervelet (i.e. Losi et al., 2004).

C'est pourquoi, dans un deuxième temps, malgré le fait que la dose la plus élevée que nous avons utilisée (150µM de NMDA) n'entraîne pas de mort cellulaire à 48h (données non montrées), nous nous sommes intéressés à la transcription impliquée de gènes répondant à l'activation de gènes extrasynaptiques (ie impliqués dans la voie apoptotique).

FOXO1 appartient à la classe des *forkhead box protein O* qui sont des facteurs de transcriptions qui peuvent entraîner la mort neuronale à la suite d'une excitotoxicité, de la

perte d'un facteur trophique et d'un stress oxydatif (Shinoda et al., 2004 ; Dick and Bading, 2010). Une forte dose de glutamate dans la fente synaptique stimule les récepteurs NMDA extrasynaptiques et entraîne l'entrée de protéines FOXO dans le noyau et le complexe FOXO1/FOXO3 va contribuer à la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Foxo1 lui-même, ou encore Txnip, Bim, FasI (pour revue Hardingham and Bading, 2010).

Nous avons comparé la transcription des gènes, par RT-qPCR, impliqués dans la plasticité à celle de Foxo1 (figure 27A).

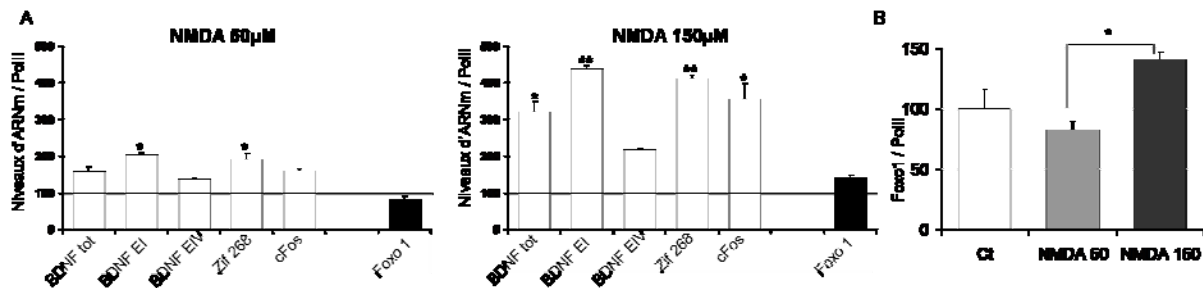


Figure 27 : Niveaux d'expression des ARNm des gènes impliqués dans la plasticité neuronale et de Foxo1 à 50 et 150µM de NMDA pendant 6h de traitement.

(A) Comparaison des niveaux d'ARNm des gènes impliqués dans la plasticité neuronale et de Foxo1 à 50µM (gauche) et à 150µM (droite). (B) Niveaux d'expression des ARNm de Foxo1 suite à un traitement 50 et 150µM de NMDA. Les niveaux d'ARNm de ces gènes ont été évalués par RT-qPCR dans une culture de CGN (DIV 5 jours). Les valeurs ont été normalisées sur la PolII. La représentation correspond à la moyenne des résultats (+/-SEM) (N=2 par groupe). Les contrôles ont été arbitrairement normalisés à 100. One-way ANOVA ou test t de Student : * p<0,05 ; ** p<0,01 ; ***p<0,001 par rapport aux contrôles.

A la dose de 50µM de NMDA, alors que tous les ARNm des gènes impliqués dans la plasticité sont augmentés, nous pouvons constater que la transcription de Foxo1 présente une tendance à la baisse (-20% par rapport aux contrôles). A 150µM de NMDA, les niveaux des ARNm des gènes de plasticité neuronale sont fortement augmentés, mais les niveaux d'ARNm de Foxo1 sont également augmentés (+40% par rapport aux contrôles). Dû au faible nombre d'échantillons utilisés dans cette étude, l'augmentation de 40% n'est pas significative. Il s'agira de répéter ces expériences. Cependant, il faut noter que les niveaux d'ARNm entre les 2 doses de NMDA sont significativement différents (test t de student, NMDA 50µM : 82% +/- 7 et NMDA 150µM : 142% +/-6, p=0,02) (figure 27B).

En conclusion, nos résultats montrent une activation d'intensité différente sur les gènes de plasticité synaptique entre NMDA 50 et 150µM. Foxo1 est quant à lui induit seulement à la dose de 150µM. Ces résultats montrent donc un effet dose dépendant sur des programmes génétiques différents ; il s'agira de vérifier comment ces programmes génétiques sont maintenus dans le temps.

Discussion

Les différents temps de traitement NMDA 50 μ M ont permis de montrer que l'on avait une cinétique particulière des acétylations des histones dans les CGN, avec tout d'abord un pic d'acétylation de H3 à une 1h puis un pic d'acétylation de H2B à 4h de traitement.

Au vu de ces résultats, on peut imaginer que l'on ait une augmentation de l'activité d'une HAT qui commence par acétyler H3, mais pas H2B (temps 1H), ou alors que l'on ait une baisse de l'activité d'une HDAC qui expliquerait cette augmentation d'acétylation de l'histone H3. Inversement, H2B présente une baisse de son acétylation à 1h, ce qui peut s'expliquer soit par l'activation d'une HDAC soit par une baisse de l'activité d'une HAT. De même, à 4h de traitement, il y a un pic d'acétylation de H2B qui peut être dû à une variation de l'activité de la balance HAT/HDAC. On peut penser que cette variation de la dynamique des acétylations des histones H3 et H2B va permettre la transcription de gènes soit de manière indépendante (l'acétylation de l'histone H3 va permettre la transcription de certains gènes et l'acétylation de H2B d'autres gènes) soit de manière synergique (par exemple l'acétylation de H2B ne permet la transcription de gène que si, préalablement, il y a eu un pic d'acétylation des histones H3). Ainsi, il est probable que cette divergence de profil d'acétylation favorise une transcription différentielle.

L'étude de l'expression des ARNm de gènes impliqués dans la plasticité et la mémorisation (Bdnf total, Bdnf-EI, Bdnf-EIV, Zif268, cFos), en RT-qPCR a permis de montrer que l'on avait, à 6h de traitement, un effet dose, avec une augmentation de la transcription plus importante de ces gènes à 150 μ M de NMDA par rapport à un traitement à 50 μ M. L'expression transcriptionnelle des gènes que nous avons choisi et qui sont impliqués dans la plasticité synaptique et la mémorisation semble donc suivre un effet dose du NMDA et par conséquent ne rend pas compte de la différence d'acétylation de H2B entre 50 μ M et 150 μ M de NMDA à 4 heures de traitement. Il est possible que l'hyperacétylation de H2B observée d'un point de vue global permette la transcription d'autres gènes (qu'il reste à identifier), mais aussi on peut imaginer que l'effet de l'hyperacétylation de H2B puisse agir sur le maintien de la transcription de gènes à plus long terme. Ainsi, la comparaison de la transcription à un temps plus long de traitement (par exemple 12 heures) entre les 2 doses, permettrait d'éclaircir ce point.

Bien que la dose de 150 μ M de NMDA ne soit pas toxique sur des cultures primaires de CGN à 48 heures (données non montrées), il semblerait que la transcription de Foxo1 qui est considéré comme un facteur de transcription de gènes apoptotiques, soit activée à cette dose. A 50 μ M de NMDA, nous avons pu observer une tendance à la baisse des niveaux d'ARNm de Foxo1 par rapport aux contrôles non traités. L'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques permettant l'activation transcriptionnelle de Foxo1 (Hardingham and Bading, 2010), on peut imaginer qu'à la dose de 50 μ M de NMDA les récepteurs extrasynaptiques ne soient pas stimulés. De plus, la baisse de la transcription de Foxo1 par rapport aux contrôles pourrait s'expliquer par la stimulation des récepteurs NMDA synaptiques. En effet, l'activation de ces récepteurs supprime l'activité de FOXO dans le noyau via l'activation de Akt qui phosphoryle le complexe FOXO1/FOXO3 entraînant son exportation dans le cytoplasme et empêchant ainsi la transcription de gènes pro-apoptotique tels que Foxo1 lui-même (Papadia et al., 2008). Par ailleurs, il a été décrit que l'activation des récepteurs NMDA synaptiques peut exercer un blocage durable du signal permettant l'entrée du complexe FOXO1/FOXO3 provenant de l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Dick and Bading, 2010). Ainsi, à la dose de 50 μ M de NMDA, il est probable que les récepteurs NMDA activés, soient en grande majorité synaptiques. Par contre, on peut imaginer qu'une dose de 150 μ M active les récepteurs extrasynaptiques et un tel signal serait suffisant pour permettre la transcription de gènes impliqués dans la voie apoptotique tels que Foxo1. Cependant, cette augmentation ne doit pas être suffisante pour mettre en danger la survie neuronale ; il est possible que des mécanismes de survie neuronale soit mis en jeu pour contrer l'activation de Foxo1 et empêcher la signalisation apoptotique d'aboutir.

Il serait intéressant de connaître la cinétique de Foxo1 à la dose de 150 μ M de NMDA, afin de savoir si les niveaux d'ARNm de Foxo1 sont plus élevés à un autre moment du traitement et donc de savoir si à 6h nous sommes au début ou à la fin d'un signal transcriptionnel. Ainsi, on peut imaginer que l'hyperacétylation plus importante de l'histone H3 observée à 1h de traitement NMDA 150 μ M par rapport à 50 μ M, va permettre l'activation transcriptionnelle de gènes tels que Foxo1 à 150 μ M mais pas à 50 μ M.

On a pu noter un effet dose avec l'acétylation de H3 entre 50 et 150 μ M de NMDA à 1h de traitement. Par contre on ne retrouve pas cet effet avec H2B, où seule la dose de 50 μ M pendant 4h, entraîne une augmentation de l'acétylation de l'histone H2B. Comme nous venons de le voir, avec la transcription de Foxo1 à 150 μ M, il est possible que les récepteurs extrasynaptiques soient activés à cette dose. Cette activation conduirait à un mécanisme différent de celui permettant les acétylations de l'histone H2B à 4h de traitement de NMDA

50 μ M. Ce mécanisme bloquerait l'hyperacétylation de l'histone H2B, via la balance HAT/HDAC, rencontrée avec un traitement de 4h à 50 μ M de NMDA.

L'ensemble de ces résultats sera à confirmer et à compléter, il serait notamment intéressant de vérifier en ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) la présence d'une hyperacétylation des histones, principalement de H2B, sur les promoteurs de ces différents gènes. Il faudrait contrôler les quantités d'ARNm des gènes étudiés, ici à 6 heures à un temps plus long afin de caractériser si la transcription de certains gènes est soutenue dans le temps aux 2 doses de NMDA. En effet, un maintien de la transcription de certains gènes à 50 μ M et pas à 150 μ M de NMDA, pourrait être la conséquence de l'augmentation d'acétylation des histones H2B observée à 4 heures de traitement NMDA. La transcription d'autres gènes impliqués dans la voie apoptotique devra être étudiée et une cinétique ainsi que des ChIP permettront de corréliser l'éventuelle variation transcriptionnelle de ces gènes à la présence d'acétylations sur les protéines histones.

Dans l'ensemble, ces résultats ont permis de montrer une activation différentielle dans le temps des histones H3 et H2B au cours d'un traitement NMDA sur une culture primaire de neurones en grains. En comparaison d'une dose « physiologique » de NMDA (50 μ M dans une culture de CGN), une forte concentration de NMDA (150 μ M dans une culture de CGN) provoque un changement du profil d'acétylation, avec notamment un blocage de l'augmentation de l'acétylation de l'histone H2B. La transcription de gènes impliqués dans la plasticité synaptique est dose dépendante (entre 50 et 150 μ M de NMDA), mais l'augmentation transcriptionnelle d'un gène impliqué dans la voie apoptotique (Foxo1) à 150 μ M de NMDA laisse penser à l'activation d'une autre voie (i.e. via les récepteurs extrasynaptiques de NMDA) que celle activée à 50 μ M de NMDA (récepteurs synaptiques).

Au final, ces résultats permettent d'établir un lien entre l'activation de la voie glutamatergique et son action sur l'acétylation des histones et notamment sur l'acétylation de l'histone H2B. Une fois cette étude complétée, ces résultats permettront de mieux comprendre comment un signal glutamatergique (NMDA) peut sous-tendre des régulations transcriptionnelles sur le long terme, par l'intermédiaire de régulations épigénétiques – acétylations d'histones – différentielles, pour à terme engager une réponse physiologique différente (plasticité versus apoptose).

**CONCLUSION
GENERALE :
PERSPECTIVES
THERAPEUTIQUES**

L'objectif final est de pouvoir améliorer les performances cognitives dans la maladie d'Alzheimer en augmentant la transcription de gènes pro-mnésiques, par l'intermédiaire d'agents pharmacologiques qui agissent sur la régulation de l'acétylation des histones.

Les niveaux d'acétylation des histones résultent d'un équilibre entre les activités HAT et HDAC. Dans le modèle lésionnel présenté dans cette thèse, ainsi que dans de nombreux modèles neurodégénératifs (Rouaux et al., 2004; Saha and Pahan, 2006; Echaniz-Laguna et al., 2008), il semblerait que les cellules neuronales perdent une HAT et, plus particulièrement, la CREB binding protein (CBP), entraînant une baisse des acétylations des histones (figure 28). Le rééquilibrage de ces niveaux d'acétylation semble être une stratégie thérapeutique intéressante. Ainsi, depuis plusieurs années, la recherche s'est focalisée sur l'expérimentation et le développement de molécules qui permettent de restaurer les niveaux d'acétylation. En effet, le rééquilibrage de ces niveaux pourrait contribuer au rétablissement de la transcription de gènes neuroprotecteurs (Langley et al., 2005; Saha and Pahan, 2006; Chouliaras et al., 2010; Chuang et al., 2009; Sleiman et al., 2009) et comme nous l'avons vu précédemment permettrait également la transcription de gènes pro-mnésiques (Vecsey et al., 2007 ; Chen et al., 2010). Ce rééquilibrage favoriserait donc le maintien du bon fonctionnement neuronal ainsi que ses conditions de survie.

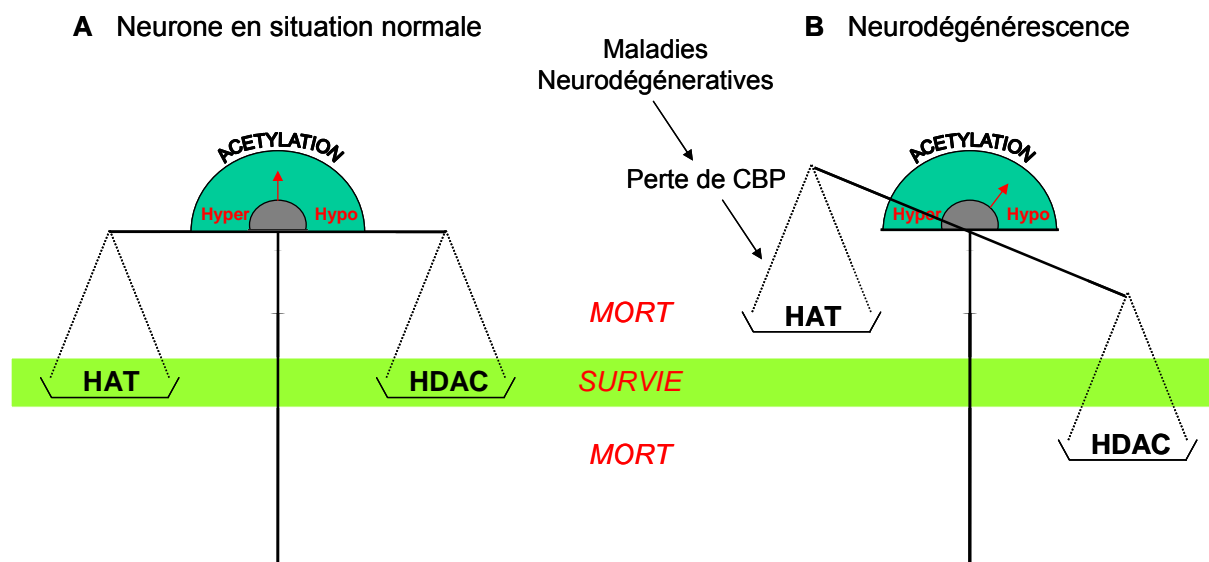


Figure 28 : La balance HAT/HDAC et la neuroprotection

(A) La neuroprotection est liée à un réglage fin des activités HAT/HDAC. (B) Le déplacement de l'équilibre HAT/HDAC en faveur d'une hypoacétylation, notamment par une perte de CBP, est observé dans plusieurs processus neurodégénératifs.

Afin d'influer sur la balance des acétylations, il est possible d'intervenir soit sur les HAT, soit sur les HDAC. Ainsi, dans le cas d'une hypoacétylation due à une perte de l'activité HAT, l'objectif thérapeutique est alors de retrouver des taux d'acétylation normaux,

c'est-à-dire à augmenter l'acétylation des histones afin de permettre la transcription de gènes pro-mnésiques et/ou neuroprotecteurs. Pour cela, deux stratégies sont possibles : soit inhiber les HDAC soit activer les HAT (figure 29).

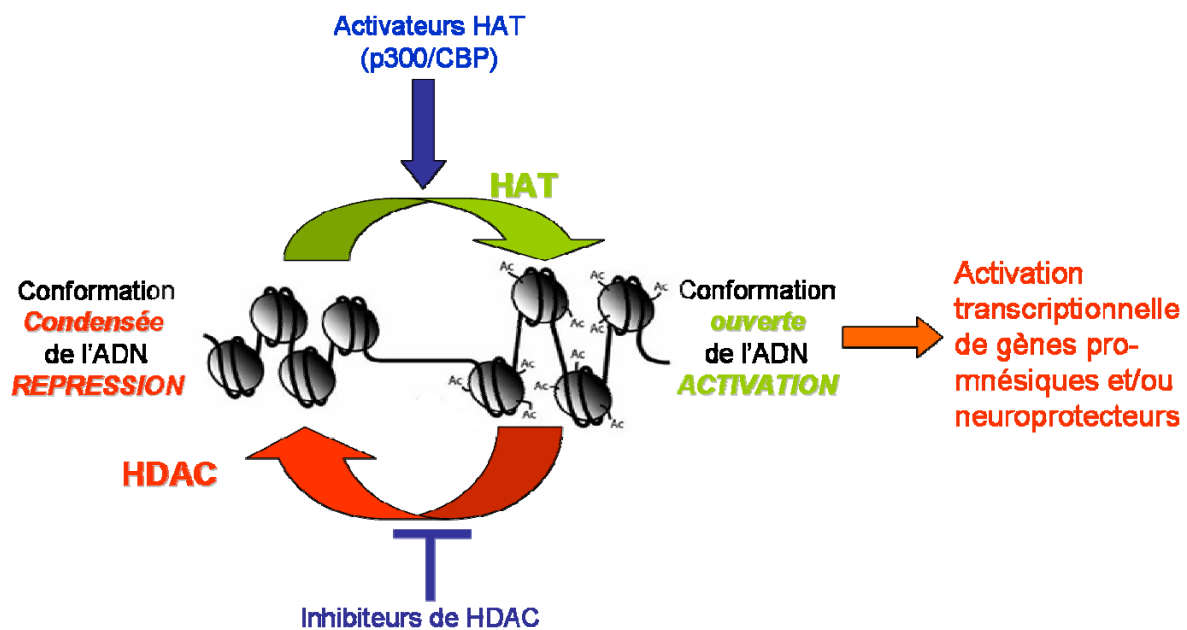


Figure 29 : Perspectives thérapeutiques en cas d'hyoacétylation due à la perte d'une HAT telle que CBP

La restauration des acétylations vise à utiliser des inhibiteurs de HDAC ou des activateurs de HAT afin de rétablir la transcription de gènes pro-mnésiques et/ou neuroprotecteurs.

I. Inhibiteurs d'Histones Déacétylases (HDACi)

Le premier inhibiteur de HDAC à avoir été identifié et caractérisé est le butyrate de sodium. Il est capable de modifier l'état d'acétylation des histones (Riggs et al., 1977), et il inhibe l'activité HDAC à la fois *in vitro* et *in vivo* (Candido et al., 1978). Quasiment une décennie plus tard la trichostatine A (TSA), un fongistatique, a été découverte ; elle induit chez une souris leucémique une différenciation cellulaire (Yoshida et al., 1987).

Une grande quantité de molécules ont été décrites qui inhibent l'activité des HDAC de classe I et II et, à part quelques exceptions, peuvent être divisées en différentes classes structurales : (1) les hydroxamates qui sont des petites molécules, tels que TSA, l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA, vorinostat), scriptaid et oxamflatin ; (2) des acides gras à chaînes courtes, tels que le butyrate de sodium, le phenylbutyrate de sodium et l'acide valproïque (VPA) ; (3) des térapeptides cycliques, tels que l'apicidine, la trapoxine et depsipeptide FK-228 ; (4) des benzamides, tel que MS-275 et C1-994 (Miller et al., 2003;

Remiszewski, 2002) ; (5) un peu plus récemment, des HDACi dérivés du mercaptoacétamide ont été développés (Kozikowski et al., 2007).

On peut noter que deux molécules ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) : le valproate de sodium et le phénylbutyrate. Cependant, au moment de leur commercialisation leur action inhibitrice des HDAC n'était pas connue. En effet, le valproate est utilisé pour son action gabaergique comme antiépileptique et le phénylbutyrate est utilisé dans les troubles du cycle de l'urée. Le SAHA ou vorinostat est le seul à être utilisé pour son action inhibiteur de HDAC dans les lymphomes cutanés à cellules T, mais il n'a pas encore d'AMM.

L'étude des hydroxamates a révélé que ces inhibiteurs agissaient en se liant à l'ion zinc au niveau du site actif des HDAC, empêchant l'activité déacétylase (Finnin et al., 1999). Par contre on ne sait pas si les autres classes de HDACi agissent en se liant directement au site de liaison du substrat.

Il faut remarquer que les HDACi n'ont pas la même affinité pour chacune des isoformes de HDAC (Tableau 2), les réponses cellulaires peuvent donc être très différentes en fonction des HDACi. On peut noter également qu'au final ce sont les butyrates qui par leur capacité à passer plus facilement la barrière hématoencéphalique sont susceptibles d'avoir une action inhibitrice de HDAC la plus efficace au niveau du système nerveux central.

Tableau 2 : Les inhibiteurs de HDAC diffèrent dans leur sélectivité des isoenzymes de HDAC (adapté de Kahn et al., 2008).

Les EC50 ont été déterminé dans des cellules HeLa. Les EC50 correspondent à une moyenne des moitiés des concentrations maximales effectives.

* = non déterminé

= aucune inhibition complète n'a été déterminée à des doses de 10µM (FK-228, Apicidin, MS-275) ou 100mM (VPA)

| Inhibiteur | Classe I EC50 | | | | Classe IIa EC50 | | | | Class IIb EC50 | |
|------------|------------------|---------|---------|---------|--------------------|-------|---------|---------|-------------------|--------|
| | HDAC1 | HDAC2 | HDAC3 | HDAC8 | HDAC4 | HDAC5 | HDAC7 | HDAC9 | HDAC8 | HDAC10 |
| TSA | 0,002µM | 0,003µM | 0,004µM | 0,456µM | 0,006µM | * | 0,005µM | 0,006µM | 0,003µM | * |
| SAHA | 0,068µM | 0,164µM | 0,048µM | 1,524µM | 0,101µM | * | 0,104µM | 0,107µM | 0,090µM | * |
| FK-228 | 0,036µM | 0,047µM | * | * | 0,510µM | * | * | * | # | * |
| Apicidin | # | 0,120µM | 0,043µM | 0,575µM | # | * | # | # | # | * |
| MS-275 | 0,181µM | 1,155µM | 2,311µM | # | # | * | # | 0,505µM | # | * |
| VPA | 1,8mM | 3,1mM | 3,1mM | 7,4mM | * | * | # | # | # | * |

II. Étude de l'implication des inhibiteurs de HDAC dans les processus de mémorisation dépendant de CBP

L'augmentation artificielle de l'acétylation des histones due à l'utilisation de trichostatine A ou de butyrate de sodium comme inhibiteurs d'histones déacétylases, permet l'induction de la potentialisation à long terme *in vitro* et la formation de la mémoire à long terme *in vivo* (Levenson et al., 2004) chez des rats ne présentant pas de problèmes mnésiques. Par la suite, quelques publications ont confirmé l'action pro-mnésique des HDACi et notamment de l'acide valproïque, du butyrate de sodium et de la TSA chez des souris subissant un conditionnement à la peur (Bredy and Barad, 2008; Bredy et al., 2007; Vecsey et al., 2007) ou dans le cas de reconnaissance d'un nouvel objet (Stefanko et al., 2009). Dans cette dernière publication, les auteurs ont montré qu'un entraînement qui normalement ne conduit pas à une mémorisation à long terme était capable de l'induire quand les HDAC étaient inhibés (Stefanko et al., 2009). Par ailleurs, il est décrit qu'une simple stimulation électrique à haute fréquence sur des tranches d'hippocampe mène à une E-LTP, c'est à dire à une LTP indépendante du processus transcriptionnel. Or l'étude de Vecsey, a permis de montrer qu'une stimulation menant classiquement à une E-LTP pouvait conduire en présence de HDACi, à une L-LTP, qui est dépendante de la transcription.

Ce qui est intéressant, c'est que non seulement ces inhibiteurs de HDAC ont une action chez des souris ou des rats qui n'ont pas de problèmes de mémoire, mais ils sont efficaces également dans des modèles présentant des troubles de la mémoire à long terme. Ainsi ces inhibiteurs de HDAC ont été testés dans les modèles transgéniques murins portant des mutations du gène de *cbp* qui présentaient donc une altération mnésique à long terme et une déficience de la phase tardive de la potentialisation (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004). Dans les deux cas, l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC, le SAHA (Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid, Alarcon et al., 2004) ou la TSA (Trichostatine A, Korzus, et al., 2004) a permis d'améliorer la mémoire à long terme des animaux mutés, à la fois dans un conditionnement à la peur (Alarcon et al., 2004) que dans la reconnaissance d'un nouvel objet (Korzus et al., 2004).

Cependant, de nouvelles études sont venues pondérer l'action des HDACi dans les modèles présentant des mutations de CBP.

En effet, on peut noter, que des souris CBP KO conditionnelles (Chen et al., 2010) traitées à la TSA ne présentent pas d'amélioration de leur mémoire à long terme dans un conditionnement à la peur dépendant du contexte. Ainsi, la compensation de la perte de la fonction HAT des souris CBP KO conditionnelles, par les HDACi n'est pas suffisante pour activer la transcription de gènes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. De même, les traitements par HDACi n'ont aucune action sur les processus de mémorisation des souris présentant une double mutation du domaine KIX de CBP ne permettant plus à CBP de se fixer sur CREB (Vecsey et al., 2007 ; McQuown et al., 2011). Dans la publication de Vecsey, les auteurs ont travaillé sur des tranches d'hippocampe de souris CBP^{KIX/KIX} et ils ont montré que la TSA ne permettait pas d'avoir une L-LTP à partir d'une stimulation entraînant une E-LTP, ce qui est pourtant le cas sur des tranches d'hippocampes d'animaux wild type. De même, les animaux présentant une mutation sur CREB (CREB $\alpha\Delta$ ne permettant plus le recrutement de CBP) ont des troubles de la mémoire à long terme en conditionnement à la peur dépendant du contexte (Vecsey et al., 2007) et un traitement par TSA ne permet pas l'amélioration de leur apprentissage (Vecsey et al., 2007). Ainsi, l'inhibition des HDAC dépendrait de CBP et de son interaction avec CREB. Afin de vérifier cette théorie *in vivo* McQuown et collaborateurs ont établi que l'administration d'inhibiteur de HDAC ne permettait pas de rétablir la mémoire à long terme pour la reconnaissance de la localisation d'un objet, confirmant l'importance de la liaison de CBP à CREB (McQuown et al., 2011). Cependant, l'étude de Stefanko et collaborateurs (Stefanko et al., 2009) a montré l'inverse, à savoir une amélioration de la reconnaissance d'un nouvel objet chez des souris CBP^{KIX/KIX} qui ont reçu du butyrate de sodium, suggérant que l'inhibition des HDAC agit sur la mémoire à long terme indépendamment de la liaison CBP/CREB.

Divers explications peuvent expliquer ces différences d'efficacités des HDACi dans tous ces modèles transgéniques de CBP.

Les HDACi ne compensent la perte d'activité de CBP que lorsque c'est la fonction HAT qui est touchée, mais que la fonction co-activatrice de CBP dépendant de sa fixation à CREB est capable d'agir au moins partiellement.

Les HDACi sont efficaces lorsqu'il y a encore un peu de CBP dans les cellules, par exemple avec une baisse de 50% de CBP la présence de HDACi est suffisante pour restaurer la mémorisation (Alarcon et al., 2004). Lorsque la fonction HAT de CBP n'est pas fonctionnelle (Korzus et al., 2004), les inhibiteurs de HDAC arrivent à compenser cette perte de fonction et à améliorer les processus mnésiques. Par contre lorsque l'on a une perte totale

de CBP (dans la région CA1 de l'hippocampe) (Chen et al., 2010) ou que CBP présente une mutation sur son domaine KIX l'empêchant de se fixer sur CREB, les HDACi n'ont pas d'effet sur la mémoire (Vecsey et al., 2007 ; McQuown et al., 2011). Ainsi dans le cas de CBP, les 2 fonctions de CBP sont importantes pour qu'il y ait transcription de gènes impliqués dans la mémoire : l'acétylation des histones dépendant de la fonction HAT de CBP mais qui peut être compensée par les HDACi (Korzus et al., 2004 ; Alarcon et al., 2004) et la fonction co-activatrice de CBP. En effet dans les publications de Korzus et d'Alarcon cette fonction est encore présente, mais l'absence de cette fonction dans les souris CBP KO conditionnelles (Chen et al., 2010) empêche la transcription de gènes impliqués dans la mémoire et cette fonction co-activatrice n'est pas rétablie avec les HDACi. De même, dans les souris CBP^{KIX/KIX}, la perte de la fonction co-activatrice dépendant de la fixation de CBP à CREB ne permet pas non plus aux HDACi de restaurer les processus mnésique de ces animaux (Vecsey et al., 2007 ; McQuown et al., 2011).

Les HDACi ne compensent la perte d'activité de CBP que lorsque le test de mémoire est dépendant de l'hippocampe.

Les études suivantes sont basées sur deux tests différents de reconnaissance d'objet : la reconnaissance d'un objet et la reconnaissance de la localisation d'un objet. Dans les deux tests, les animaux sont placés dans un dispositif expérimental dans lequel il y a deux objets (figure 30). Les animaux vont explorer les deux objets et enregistrer deux informations principales : les objets en eux-mêmes et leur localisation dans le dispositif dans lequel ils sont. Si l'on veut déterminer leur capacité à reconnaître un objet, les animaux subissent un test de rétention dans le même dispositif que précédemment, avec les objets placés au même endroit, mais avec un des deux objets qui a changé. Les animaux ne présentant pas de troubles mnésiques vont explorer préférentiellement le nouvel objet (car ils connaissent l'autre objet). Si l'on veut déterminer leur capacité à identifier la localisation des objets, les animaux subissent un test de rétention dans le même dispositif que précédemment, avec les mêmes objets que durant l'acquisition, mais avec un des objets qui a été changé de place. Les animaux ne présentant pas de troubles mnésiques vont explorer préférentiellement l'objet qui a changé de place.

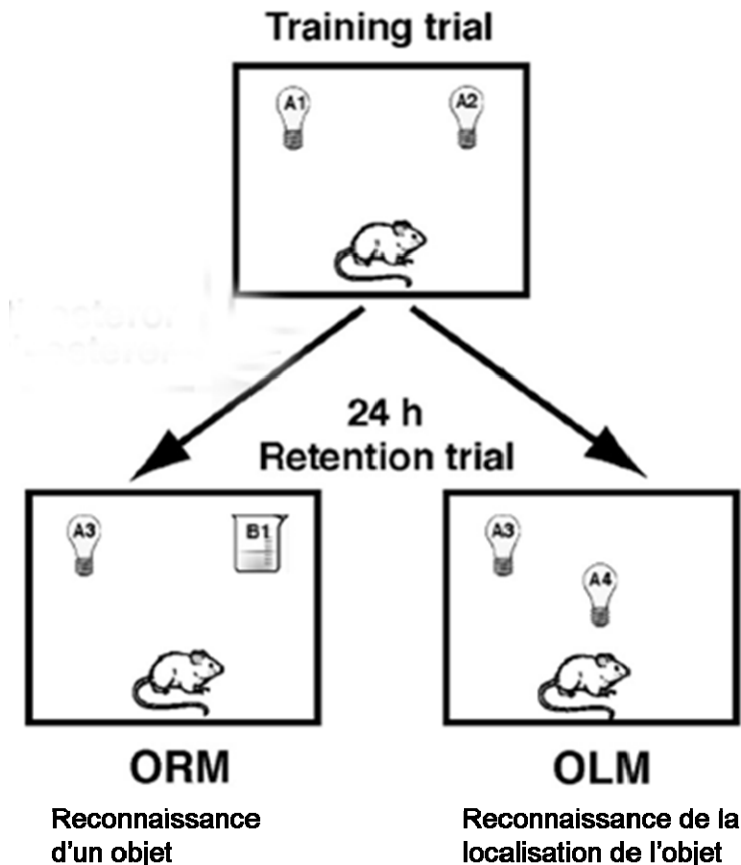


Figure 30 : Schématisation des tests de reconnaissance d'objet (adapté de Roozendaal et al., 2010).

Les animaux subissent un entraînement (*training trial*), puis soit un test explorant leur capacité mnésique à reconnaître un objet (*object recognition memory ORM*) soit un test explorant leur capacité mnésique à reconnaître la localisation d'un objet (*object location memory OLM*).

Comme nous l'avons vu, il existe des résultats contradictoires sur la capacité des HDACi à améliorer les processus de mémorisation des souris $CBP^{KIX/KIX}$. Dans l'étude de McQuown et collaborateurs, les HDACi n'améliorent pas la mémoire des souris $CBP^{KIX/KIX}$ dans une tâche de localisation d'objet (OLM). Dans l'étude de Stefanko et collaborateurs, les HDACi permettent l'amélioration de la mémoire des souris $CBP^{KIX/KIX}$ dans un test de reconnaissance d'un objet (ORM). Ainsi, il semblerait que les HDACi agissent différemment en fonction de la tâche (OLM versus ORM). De fait, il a été découvert que la tâche de reconnaissance d'un objet (ORM) ne fait pas intervenir l'hippocampe et par conséquent n'engage pas les mécanismes dépendant de CBP dans l'hippocampe. En effet, il a été montré que de rats ayant subi des lésions bilatérales excitotoxiques de l'hippocampe, présentent des déficits de mémoire spatiale (mesurés dans un test de labyrinthe radial), mais une ORM normale (Balderas et al., 2008). Par contre, des lésions du cortex peri-postrhinal, permet aux rats d'avoir une mémoire spatiale normale, mais des déficits d'ORM (Balderas et al., 2008).

De plus, une très récente étude (Haettig et al., 2011) a montré que les HDACi permettaient effectivement une amélioration de la mémoire à long terme dans une tâche de reconnaissance d'un objet (ORM) de manière indépendante de la fixation de CBP à CREB, comme dans la publication de Stefanko et collaborateurs (2009) ; mais les HDACi ne permettaient pas l'amélioration de la mémoire à long terme dans une tâche de mémorisation de la localisation de l'objet (OLM) lorsque le domaine KIX de CBP était muté. Ainsi lorsqu'une tâche est impliquée dans la mémoire spatiale (par exemple un test OLM), donc faisant intervenir l'hippocampe, celle-ci va être dépendante de la liaison de CBP à CREB. Cela est cohérent avec nos résultats du chapitre 1 (Bousiges et al., 2010), où nous avons pu montrer que lors d'un apprentissage spatiale en piscine de Morris, les rats présentaient une augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de CBP et qu'une dénervation de l'hippocampe perturbait la mémoire spatiale de manière dépendante de CBP. Une autre étude récente a montré que les glucocorticoïdes amélioraient la consolidation de la mémoire via l'acétylation des histones (Roozendaal et al., 2010). Plus spécifiquement, les glucocorticoïdes, de la même manière que les HDACi de la publication de Haettig, amélioraient la mémoire pour la reconnaissance normale d'objet de manière indépendante de la liaison de CBP à CREB, alors qu'ils amélioraient la mémoire de la localisation de l'objet de manière dépendante de cette liaison CBP/CREB. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les HDACi modulent la mémoire à long terme dans l'hippocampe via un mécanisme dépendant de CBP. Ces expérimentations avec les HDACi ont permis de montrer que CBP semblait jouer un rôle indispensable dans la formation de la mémoire spatiale dans l'hippocampe.

III. Application thérapeutique des HDACi dans les pathologies de la mémoire

Les HDACi ont également été testées dans des modèles de souris Alzheimer. Le phénylbutyrate a montré qu'il permettait d'améliorer l'apprentissage spatial (Ricobaraza et al., 2009) et la mémoire liée à un conditionnement à la peur (Ricobaraza et al., 2010) de souris portant une mutation du gène APP (APP Swe). Cet inhibiteur de HDAC permettrait de diminuer la forme hyperphosphorylée de la protéine tau, via une augmentation de la forme inactive de la GSK3 β (Ricobaraza et al., 2009), mais aussi de restaurer les pertes des épines dendritiques de ces souris transgéniques (Ricobaraza et al., 2010). Le phénylbutyrate apparait

ainsi extrêmement intéressant dans le traitement des déficits cognitifs liés à la MA. Les HDACi, tels que le valproate de sodium, le butyrate de sodium ainsi que le SAHA restaurent complètement la mémoire liée à un conditionnement à la peur dépendant du contexte chez des souris double transgéniques (APP/PS1) (Kilgore et al., 2010). Chez ces mêmes souris transgéniques, la trichostatine A a également prouvée qu'elle améliorait les déficits mnésiques et les dysfonctions synaptiques de l'hippocampe (Francis et al., 2009). A noter que ces inhibiteurs de HDAC ont également permis une amélioration des fonctions cognitives et notamment la mémoire spatiale d'un modèle inductible de neurodégénérescence (Fischer et al., 2007), ou encore d'un modèle présentant des lésions traumatiques du cortex pariétal (Dash et al., 2009). Enfin, il a été découvert que les *DNA methyltransferases* (DNMT) qui méthylent l'ADN sont impliquées dans la plasticité synaptique, en effet, l'inhibition des DNMT altère la LTP (Levenson et al., 2006). Cependant, un traitement par la TSA peut restaurer le déficit de LTP causé par l'inhibition des DNMT (Miller et al., 2008). Ainsi, il semblerait que la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones ont un rôle important et interagissent dans la consolidation de la mémoire et la plasticité synaptique.

Le vieillissement (facteur de risque principal de la maladie d'Alzheimer) même physiologique est associé à des perturbations mnésiques. Or, suite à un traitement de SAHA, des souris C57BL/6 âgées (16 mois) qui présentent des troubles de la mémoire (en conditionnement à la peur), voient leur capacité mnésique augmentée significativement (Peleg et al., 2010).

Les inhibiteurs de HDAC ciblent indifféremment plusieurs classes de HDAC avec plus ou moins de spécificité en fonction des HDACi (voir tableau 1). Kilgore et collaborateurs suggèrent que l'inhibition des HDAC de classe I sont efficaces pour améliorer la mémorisation (Kilgore et al., 2010). Des études récentes ont essayé de déterminer plus précisément les HDAC jouant un rôle dans les processus de mémorisation. D'après une étude du laboratoire de Tsai, il semblerait que HDAC2 joue un rôle extrêmement important dans ces processus de mémorisation (Guan et al., 2009). En effet, des souris HDAC2 knock-out présentent une amélioration de la mémorisation et de la plasticité synaptique, alors qu'une surexpression de HDAC2 perturbe la mémoire de ces souris (Guan et al., 2009). A noter qu'un traitement par SAHA permet de restaurer les fonctions mnésiques des souris surexprimant HDAC2 (Guan et al., 2009). On peut souligner que l'acide valproïque induit une dégradation protéosomique de HDAC2 contrairement aux autres HDACi (Kramer et al., 2003), lui conférant ainsi une action supplémentaire intéressante comme agent pro-mnésique. Guan et collaborateurs ont également démontré que HDAC1 n'intervenait pas dans ces

processus de mémorisation (Guan et al., 2009). Une étude très récente montre également l'implication de HDAC3 dans la mémorisation (McQuown et al., 2011). Autant les souris HDAC3 KO inductible que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de HDAC3 (RGFP136) montrent que la baisse de l'activité de HDAC3 augmente la mémoire à long terme de manière persistante en ORM et OLM (McQuown et al., 2011). Ainsi une molécule capable d'inhiber plus spécifiquement ces HDAC (HDAC2 et 3), pourrait avoir un intérêt dans la restauration des fonctions cognitives chez les patients atteints de la MA.

Comme nous l'avons vu, la plupart des HDACi classiques inhibent essentiellement la classe I et dans une moindre mesure la classe II des HDAC, cependant une étude intéressante a démontré que le nicotinamide, un inhibiteur des sirtuins qui appartient à la classe III des HDAC, permettait après 4 mois de traitement de réduire les déficits cognitifs dans des modèles de souris Alzheimer triple transgéniques (Green et al., 2008).

Une autre action importante des HDACi a été mise en évidence récemment. Nous avons vu en introduction que les HAT pouvaient être déacétylées par les HDAC. Or, la TSA a permis d'augmenter l'acétylation et la stabilité de p300 (Kim et al., 2010). Ainsi, même si d'autres études doivent être menées avec d'autres HDACi afin de confirmer cette action sur les HAT, on peut imaginer que les HDACi permettent d'activer la transcription en agissant non seulement sur la déacétylation des histones mais également en stabilisant les HAT en les maintenant acétylées.

Ces inhibiteurs de HDAC sont extrêmement intéressants d'autant qu'en plus des propriétés pro-mnésiques, ils présentent des propriétés neuroprotectrices, *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles de maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Huntington, l'atrophie musculaire spinobulbaire ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Chouliaras et al., 2010; Chuang et al., 2009; Langley et al., 2005; Rouaux et al., 2004; Rouaux et al., 2007; Saha and Pahan, 2006; Sleiman et al., 2009).

Globalement, les inhibiteurs de HDAC semblent agir non seulement dans les déficits de mémoire à long terme, mais aussi dans les événements à l'origine de la mort neuronale durant la MA. Leur utilisation dans des pathologies telles que la MA présente donc un double intérêt thérapeutique.

Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC a ses limites. Outre le fait qu'à certaines doses, ils peuvent se révéler toxiques, et plus particulièrement sur les populations de neurones (Boutillier et al., 2003; Salminen et al., 1998), ils peuvent surtout ne pas être suffisamment spécifiques au vu du nombre d'isoformes de HDAC existants.

IV. Une nouvelle stratégie thérapeutique : utilisation d'activateurs des histones acétyltransférases.

Dans l'objectif d'augmenter les acétylations des histones pour permettre la transcription de gènes d'intérêt, les activateurs de HAT peuvent sembler pertinents. En effet, cette classe permettrait de cibler plus finement les gènes pro-mnésiques et neuroprotecteurs, notamment en utilisant un activateur de CBP. En effet, nous avons vu précédemment l'importance des HAT et plus particulièrement celle de CBP dans les processus mnésiques et neuroprotecteurs. Une récente publication a montré que des souris CBP KO conditionnelles présentaient des déficits non seulement de la mémoire à long terme mais également de la mémoire à court terme (Chen et al., 2010). D'autre part, des souris triple transgéniques MA recevant des particules virales contenant CBP, dans leur hippocampe, présentent une amélioration de leur apprentissage et de leur mémorisation en piscine de Morris (Caccamo et al., 2010). Ainsi, l'activation de CBP paraît extrêmement intéressante pour améliorer les processus mnésiques de la MA. Jusqu'à maintenant leur utilité était compromise du fait de leur incapacité à passer les membranes, mais l'arrivée de nanoparticules comme vecteur pourrait relancer leur utilisation.

Un aspect original de notre recherche repose sur une collaboration avec le laboratoire du Dr. T. Kundu (JNC SAR, Bangalore, India), qui travaille depuis longtemps sur les modulateurs de HAT. Il a récemment publié une nouvelle technique pour propager un activateur spécifique de CBP/p300 dans l'organisme entier et notamment celle-ci permet le passage des molécules à travers la barrière hématoencéphalique et donc de propager ces molécules jusqu'au cerveau (Selvi et al., 2008). En effet, la molécule appropriée (ici, le N-(4-chloro-3-trifluorométhylphényl)-2-éthoxybenzamide appelé CTBP, un activateur de p300/CBP) est couplée avec des nanoparticules de carbone (*carbon sphere particle CSP*), que l'on peut ensuite injecter par voie intra-péritonéale par exemple. Récemment, la molécule CTBP couplée aux nanoparticules de carbone a été injectée chez des rats afin d'étudier son action sur l'acétylation des histones dans l'hippocampe (Selvi et al., 2010). L'activateur de HAT augmente l'acétylation de l'histone H3 de 2 fois dans l'hippocampe dorsal, comme le traitement à l'acide valproïque. Il est intéressant de noter que cette molécule permet l'augmentation de l'acétylation de l'histone H2B de 1,5 fois alors que l'acide valproïque ne change pas significativement cette modification épigénétique (Selvi et al., 2010). On peut noter que l'augmentation de l'acétylation de H2B suite à ce traitement d'activateur de

p300/CBP est cohérent avec les études qui ont montré qu'une baisse de l'activité de CBP entraînait une baisse de l'acétylation de H2B (Korzus et al., 2004 ; Valor et al., 2011) ; mais est également en accord avec nos résultats (Bousiges et al., 2010) qui montrent qu'à la suite d'un apprentissage spatial il existe un parallèle entre l'augmentation de CBP et l'augmentation de l'acétylation de H2B. Par ailleurs, la molécule de CTBP induit des altérations structurales de p300 impliquant des changements conformationnels qui vont influencer l'activité acétyltransférase. Ainsi, la molécule de CTBP a montré qu'elle activait l'autoacétylation de p300 et l'activation de la transcription (Selvi et al., 2008).

Par la suite, il serait ainsi intéressant de tester des inhibiteurs de HDAC (notamment de HDAC2/HDAC3) ou des activateurs de HAT spécifiques (CBP/p300 ou de PCAF) dans le but de réactiver les programmes génétiques déficients au cours de la pathologie, en modulant les niveaux d'acétylation impliqué dans les processus de mémorisation.

Cela nous permettra de mieux comprendre si et comment une stratégie basée sur l'utilisation de telles molécules peut être efficace pour contrer/retarder les pertes cognitives qui ont un effet dévastateur sur la qualité de vie des patients atteints de la MA.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasland, R., Gibson, T.J., and Stewart, A.F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20, 56-59.
- Abbott, R.D., White, L.R., Ross, G.W., Masaki, K.H., Curb, J.D., and Petrovitch, H. (2004). Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA* 292, 1447-1453.
- Abraham, W.C. (2003). How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 735-744.
- Abraham, W.C., Mason, S.E., Demmer, J., Williams, J.M., Richardson, C.L., Tate, W.P., Lawlor, P.A., and Dragunow, M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56, 717-727.
- Acharya, M.R., Sparreboom, A., Venitz, J., and Figg, W.D. (2005). Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* 68, 917-932.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85, 525-535.
- Ait-Si-Ali, S., Carlisi, D., Ramirez, S., Upegui-Gonzalez, L.C., Duquet, A., Robin, P., Rudkin, B., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. (1999). Phosphorylation by p44 MAP Kinase/ERK1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 157-162.
- Ait-Si-Ali, S., Polesskaya, A., Filleur, S., Ferreira, R., Duquet, A., Robin, P., Vervish, A., Trouche, D., Cabon, F., and Harel-Bellan, A. (2000). CBP/p300 histone acetyltransferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* 19, 2430-2437.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F.X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J.A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L.L., Ducommun, B., *et al.* (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* 396, 184-186.
- Alarcon, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., and Barco, A. (2004). Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42, 947-959.
- Alberini, C.M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89, 121-145.
- Alberini, C.M., Ghirardi, M., Metz, R., and Kandel, E.R. (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 76, 1099-1114.
- Albrecht, S., Bogdanovic, N., Ghetti, B., Winblad, B., and LeBlanc, A.C. (2009). Caspase-6 activation in familial Alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin 1 or presenilin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 1282-1293.
- Albrecht, S., Bourdeau, M., Bennett, D., Mufson, E.J., Bhattacharjee, M., and LeBlanc, A.C. (2007). Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *Am J Pathol* 170, 1200-1209.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhattar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.

- Alvarez, P., and Squire, L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7041-7045.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., *et al.* (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53, 1992-1997.
- Andersen, P., Blackstad, T.W., and Lomo, T. (1966). Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res* 1, 236-248.
- Anderson, P., and Lomo, T. (1966). Mode of activation of hippocampal pyramidal cells by excitatory synapses on dendrites. *Exp Brain Res* 2, 247-260.
- Andrisani, O.M. (1999). CREB-mediated transcriptional control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9, 19-32.
- Anne-Laurence, B., Caroline, R., Irina, P., and Jean-Philippe, L. (2007). Chromatin acetylation status in the manifestation of neurodegenerative diseases: HDAC inhibitors as therapeutic tools. *Subcell Biochem* 41, 263-293.
- Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., and Sweatt, J.D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1, 602-609.
- Avvakumov, N., and Cote, J. (2007). The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* 26, 5395-5407.
- Aylward, E.H., Li, Q., Stine, O.C., Ranen, N., Sherr, M., Barta, P.E., Bylsma, F.W., Pearlson, G.D., and Ross, C.A. (1997). Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 48, 394-399.
- Baddeley, A. (2001). The concept of episodic memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1345-1350.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C.J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J.L., and Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* 15, 618-624.
- Bamji, S.X., Rico, B., Kimes, N., and Reichardt, L.F. (2006). BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions. *J Cell Biol* 174, 289-299.
- Banich, M.T., Mackiewicz, K.L., Depue, B.E., Whitmer, A.J., Miller, G.A., and Heller, W. (2009). Cognitive control mechanisms, emotion and memory: a neural perspective with implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 613-630.
- Bannerman, D.M., Yee, B.K., Lemaire, M., Wilbrecht, L., Jarrard, L., Iversen, S.D., Rawlins, J.N., and Good, M.A. (2001). The role of the entorhinal cortex in two forms of spatial learning and memory. *Exp Brain Res* 141, 281-303.
- Barco, A., Patterson, S., Alarcon, J.M., Gromova, P., Mata-Roig, M., Morozov, A., and Kandel, E.R. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 48, 123-137.

- Barnes, D.E., Yaffe, K., Satariano, W.A., and Tager, I.B. (2003). A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *J Am Geriatr Soc* 51, 459-465.
- Barrett, R.M., and Wood, M.A. (2008). Beyond transcription factors: the role of chromatin modifying enzymes in regulating transcription required for memory. *Learn Mem* 15, 460-467.
- Baulieu, E.E., Robel, P., and Schumacher, M. (2001). Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol* 46, 1-32.
- Baxter, M.G., Holland, P.C., and Gallagher, M. (1997). Disruption of decrements in conditioned stimulus processing by selective removal of hippocampal cholinergic input. *J Neurosci* 17, 5230-5236.
- Beckmann, A.M., and Wilce, P.A. (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 31, 477-510; discussion 517-476.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261-277.
- Bennett, D.A., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Wilson, R.S. (2005). Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. *Neurology* 64, 834-841.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Bestor, T.H., and Verdine, G.L. (1994). DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 6, 380-389.
- Bhattacharjee, V., Horn, K.H., Singh, S., Webb, C.L., Pisano, M.M., and Greene, R.M. (2009). CBP/p300 and associated transcriptional co-activators exhibit distinct expression patterns during murine craniofacial and neural tube development. *Int J Dev Biol* 53, 1097-1104.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14, 2919-2937.
- Black, J.C., Mosley, A., Kitada, T., Washburn, M., and Carey, M. (2008). The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell* 32, 449-455.
- Blanco-Garcia, N., Asensio-Juan, E., de la Cruz, X., and Martinez-Balbas, M.A. (2009). Autoacetylation regulates P/CAF nuclear localization. *J Biol Chem* 284, 1343-1352.
- Blendy, J.A., Schmid, W., Kiessling, M., Schutz, G., and Gass, P. (1995). Effects of kainic acid induced seizures on immediate early gene expression in mice with a targeted mutation of the CREB gene. *Brain Res* 681, 8-14.
- Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Bolger, T.A., and Yao, T.P. (2005). Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J Neurosci* 25, 9544-9553.

- Bordoli, L., Husser, S., Luthi, U., Netsch, M., Osmani, H., and Eckner, R. (2001). Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity. *Nucleic Acids Res* 29, 4462-4471.
- Borrow, J., Stanton, V.P., Jr., Andresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S., Civin, C.I., Distech, C., Dube, I., Frischauf, A.M., *et al.* (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14, 33-41.
- Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R., and Tully, T. (2003). A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10518-10522.
- Bousiges, O., Vasconcelos, A.P., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.P., Cassel, J.C., and Boutillier, A.L. 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.
- Boutillier, A.L., Trinh, E., and Loeffler, J.P. (2003). Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis. *J Neurochem* 84, 814-828.
- Bredy, T.W., and Barad, M. (2008). The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 15, 39-45.
- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., and 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.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Brunelli, M., Castellucci, V., and Kandel, E.R. (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* 194, 1178-1181.
- Bruno, V., Copani, A., Knopfel, T., Kuhn, R., Casabona, G., Dell'Albani, P., Condorelli, D.F., and Nicoletti, F. (1995a). Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* 34, 1089-1098.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., Giffard, R.G., Raciti, G., Raffaele, R., Shinozaki, H., and Nicoletti, F. (1995b). Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur J Neurosci* 7, 1906-1913.
- Bu, P., Evrard, Y.A., Lozano, G., and Dent, S.Y. (2007). Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol* 27, 3405-3416.

- Buchan, A.M., Li, H., Cho, S., and Pulsinelli, W.A. (1991). Blockade of the AMPA receptor prevents CA1 hippocampal injury following severe but transient forebrain ischemia in adult rats. *Neurosci Lett* 132, 255-258.
- Buck, S.W., Gallo, C.M., and Smith, J.S. (2004). Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases. *J Leukoc Biol* 75, 939-950.
- Buggy, J.J., Sideris, M.L., Mak, P., Lorimer, D.D., McIntosh, B., and Clark, J.M. (2000). Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* 350 Pt 1, 199-205.
- Burger, C., Lopez, M.C., Feller, J.A., Baker, H.V., Muzyczka, N., and Mandel, R.J. (2007). Changes in transcription within the CA1 field of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Learn Mem* 87, 21-41.
- Burley, S.K., and Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65, 769-799.
- Caccamo, A., Maldonado, M.A., Bokov, A.F., Majumder, S., and Oddo, S. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22687-22692.
- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A., and Berger, S.L. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* 16, 593-602.
- Candido, E.P., Reeves, R., and Davie, J.R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14, 105-113.
- Cao, X., Mahendran, R., Guy, G.R., and Tan, Y.H. (1993). Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem* 268, 16949-16957.
- Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Cao, X., and Sudhof, T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279, 24601-24611.
- Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28, 436-445.
- Carvalho, A.L., Duarte, C.B., and Carvalho, A.P. (2000). Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. *Neurochem Res* 25, 1245-1255.
- Cassel, J.C., Mathis, C., Majchrzak, M., Moreau, P.H., and Dalrymple-Alford, J.C. (2008). Coexisting cholinergic and parahippocampal degeneration: a key to memory loss in dementia and a challenge for transgenic models? *Neurodegener Dis* 5, 304-317.
- Castellani, R.J., Rolston, R.K., and Smith, M.A. Alzheimer disease. *Dis Mon* 56, 484-546.
- Castillo, P.E., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182-186.

- Chan, W.Y., Lorke, D.E., Tiu, S.C., and Yew, D.T. (2002). Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat Rec* 267, 261-276.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., Arthur, J.S., and Reul, J.M. (2008). The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur J Neurosci* 27, 2701-2713.
- Chandramohan, Y., Droste, S.K., and Reul, J.M. (2007). Novelty stress induces phospho-acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl-D-aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction. *J Neurochem* 101, 815-828.
- Changelian, P.S., Feng, P., King, T.C., and Milbrandt, J. (1989). Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 377-381.
- Chawla, S., Hardingham, G.E., Quinn, D.R., and Bading, H. (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 281, 1505-1509.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F.J., Huang, C.L., and Bading, H. (2003). Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem* 85, 151-159.
- Chen, C.J., Deng, Z., Kim, A.Y., Blobel, G.A., and Lieberman, P.M. (2001). Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators. *Mol Cell Biol* 21, 476-487.
- Chen, G., Zou, X., Watanabe, H., van Deursen, J.M., and Shen, J. (2010). CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *J Neurosci* 30, 13066-13077.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.
- Chen, Q.S., Wei, W.Z., Shimahara, T., and Xie, C.W. (2002). Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 77, 354-371.
- Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., and Greenberg, M.E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889.
- Chen, W.G., West, A.E., Tao, X., Corfas, G., Szentirmay, M.N., Sawadogo, M., Vinson, C., and Greenberg, M.E. (2003). Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons. *J Neurosci* 23, 2572-2581.
- Chevillard-Briet, M., Trouche, D., and Vandiel, L. (2002). Control of CBP co-activating activity by arginine methylation. *EMBO J* 21, 5457-5466.

- Chiba, A.A., Bucci, D.J., Holland, P.C., and Gallagher, M. (1995). Basal forebrain cholinergic lesions disrupt increments but not decrements in conditioned stimulus processing. *J Neurosci* 15, 7315-7322.
- Chibnall, J.T., and Eastwood, R. (1998). Postsecondary education and dementia risk in older Jesuit priests. *Int Psychogeriatr* 10, 359-368.
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K.K., Barnes, J.M., Collingridge, G.L., and Henley, J.M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379, 78-81.
- Chouliaras, L., Rutten, B.P., Kenis, G., Peerbooms, O., Visser, P.J., Verhey, F., van Os, J., Steinbusch, H.W., and van den Hove, D.L. (2010). Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 90, 498-510.
- Christy, B., and Nathans, D. (1989a). DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8737-8741.
- Christy, B., and Nathans, D. (1989b). Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol* 9, 4889-4895.
- Christy, B.A., Lau, L.F., and Nathans, D. (1988). A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7857-7861.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
- Chuang, D.M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.J., and Chiu, C.T. (2009). Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 32, 591-601.
- Churchill, J.D., Grossman, A.W., Irwin, S.A., Galvez, R., Klintsova, A.Y., Weiler, I.J., and Greenough, W.T. (2002). A converging-methods approach to fragile X syndrome. *Dev Psychobiol* 40, 323-338.
- Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., and Sweatt, J.D. (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci* 27, 12732-12742.
- Chwang, W.B., O'Riordan, K.J., Levenson, J.M., and Sweatt, J.D. (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* 13, 322-328.
- Cobb, J.L., Wolf, P.A., Au, R., White, R., and D'Agostino, R.B. (1995). The effect of education on the incidence of dementia and Alzheimer's disease in the Framingham Study. *Neurology* 45, 1707-1712.
- Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340, 474-476.
- Comuzzi, B., Nemes, C., Schmidt, S., Jasarevic, Z., Lodde, M., Pycha, A., Bartsch, G., Offner, F., Culig, Z., and Hobisch, A. (2004). The androgen receptor co-activator CBP is

- up-regulated following androgen withdrawal and is highly expressed in advanced prostate cancer. *J Pathol* 204, 159-166.
- Connor, B., Young, D., Lawlor, P., Gai, W., Waldvogel, H., Faull, R.L., and Dragunow, M. (1996). Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 42, 1-17.
- Connor, B., Young, D., Yan, Q., Faull, R.L., Synek, B., and Dragunow, M. (1997). Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49, 71-81.
- Coogan, A.N., O'Neill, L.A., and O'Connor, J.J. (1999). The P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 antagonizes the inhibitory effects of interleukin-1beta on long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* 93, 57-69.
- Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S., and Khochbin, S. (1999). Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry* 38, 8826-8830.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., *et al.* (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136, 551-564.
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C.D., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2003). Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 116, 4905-4914.
- Cunha, R.A., Malva, J.O., and Ribeiro, J.A. (1999). Kainate receptors coupled to G(i)/G(o) proteins in the rat hippocampus. *Mol Pharmacol* 56, 429-433.
- Dash, P.K., Zhao, J., Orsi, S.A., Zhang, M., and Moore, A.N. (2009). Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 460, 103-107.
- Daujat, S., Bauer, U.M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* 12, 2090-2097.
- Davis, K.L., Mohs, R.C., Marin, D., Purohit, D.P., Perl, D.P., Lantz, M., Austin, G., and Haroutunian, V. (1999). Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 281, 1401-1406.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., and Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20, 4563-4572.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- Dechant, G., and Barde, Y.A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5, 1131-1136.

- DeKosky, S.T., Ikonomic, M.D., Styren, S.D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D.A., Cochran, E.J., Kordower, J.H., and Mufson, E.J. (2002). Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51, 145-155.
- Dekker, F.J., and Haisma, H.J. (2009). Histone acetyl transferases as emerging drug targets. *Drug Discov Today* 14, 942-948.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Wattez, A., Maurage, C.A., Lebert, F., Pasquier, F., and David, J.P. (2002). Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp Gerontol* 37, 1291-1296.
- deToledo-Morrell, L., Stoub, T.R., Bulgakova, M., Wilson, R.S., Bennett, D.A., Leurgans, S., Wu, J., and Turner, D.A. (2004). MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* 25, 1197-1203.
- Dick, O., and Bading, H. (2010). Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 285, 19354-19361.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571-3583.
- Dornan, W.A., McCampbell, A.R., Tinkler, G.P., Hickman, L.J., Bannon, A.W., Decker, M.W., and Gunther, K.L. (1997). Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin. *Behav Brain Res* 86, 181-189.
- Dragunow, M. (2004). CREB and neurodegeneration. *Front Biosci* 9, 100-103.
- Du, A.T., Schuff, N., Amend, D., Laakso, M.P., Hsu, Y.Y., Jagust, W.J., Yaffe, K., Kramer, J.H., Reed, B., Norman, D., *et al.* (2001). Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, 441-447.
- Du, A.T., Schuff, N., Zhu, X.P., Jagust, W.J., Miller, B.L., Reed, B.R., Kramer, J.H., Mungas, D., Yaffe, K., Chui, H.C., *et al.* (2003). Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology* 60, 481-486.
- Duce, J.A., Tsatsanis, A., Cater, M.A., James, S.A., Robb, E., Wikhe, K., Leong, S.L., Perez, K., Johanssen, T., Greenough, M.A., *et al.* (2010). Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell* 142, 857-867.
- Duclot, F., Meffre, J., Jacquet, C., Gongora, C., and Maurice, T. (2010). Mice knock out for the histone acetyltransferase p300/CREB binding protein-associated factor develop a resistance to amyloid toxicity. *Neuroscience* 167, 850-863.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55, 51-86.

- Echaniz-Laguna, A., Bousiges, O., Loeffler, J.P., and Boutillier, A.L. (2008). Histone deacetylase inhibitors: therapeutic agents and research tools for deciphering motor neuron diseases. *Curr Med Chem* 15, 1263-1273.
- Eden, S., Hashimshony, T., Keshet, I., Cedar, H., and Thorne, A.W. (1998). DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394, 842.
- English, J.D., and Sweatt, J.D. (1996). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 271, 24329-24332.
- English, J.D., and Sweatt, J.D. (1997). A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272, 19103-
- Fahnestock, M., Garzon, D., Holsinger, R.M., and Michalski, B. (2002). Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*, 241-252.
- Fanselow, M.S., and Dong, H.W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.
- Fanselow, M.S., Kim, J.J., Yipp, J., and De Oca, B. (1994). Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav Neurosci* 108, 235-240.
- Ferrer, I., Marin, C., Rey, M.J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., Tolosa, E., and Marti, E. (1999). BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 729-739.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., and Tsai, L.H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178-182.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W., and Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* 9, 45-57.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999). A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem* 274, 11713-11720.
- Forette, F., Seux, M.L., Staessen, J.A., Thijs, L., Birkenhager, W.H., Babarskiene, M.R., Babeanu, S., Bossini, A., Gil-Extremera, B., Giererd, X., *et al.* (1998). Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* 352, 1347-1351.
- Francis, Y.I., Fa, M., Ashraf, H., Zhang, H., Staniszewski, A., Latchman, D.S., and Arancio, O. (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18, 131-139.
- Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.

- Fratiglioni, L., De Ronchi, D., and Aguero-Torres, H. (1999). Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 15, 365-375.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., and Nicoll, R.A. (2001). Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J Neurosci* 21, 2958-2966.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., and Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452, 57-65.
- Frolich, L. (2002). The cholinergic pathology in Alzheimer's disease--discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J Neural Transm* 109, 1003-1013.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24, 88-91.
- Fumagalli, F., Racagni, G., and Riva, M.A. (2006). The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Pharmacogenomics J* 6, 8-15.
- Galasinski, S.C., Resing, K.A., Goodrich, J.A., and Ahn, N.G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem* 277, 19618-19626.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., and Mansuy, I.M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970-975.
- Gibbs, M.E., Hutchinson, D., and Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 927-944.
- Gielen, M. (2010). [Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission]. *Med Sci (Paris)* 26, 65-72.
- Gill, G. (2001). Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 37, 33-43.
- Giordano, A., and Avantaggiati, M.L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 181, 218-230.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., *et al.* (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Godde, J.S., Nakatani, Y., and Wolffe, A.P. (1995). The amino-terminal tails of the core histones and the translational position of the TATA box determine TBP/TFIIA association with nucleosomal DNA. *Nucleic Acids Res* 23, 4557-4564.
- Goldman, P.S., Tran, V.K., and Goodman, R.H. (1997). The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* 52, 103-119; discussion 119-120.

- Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W., Jr., Morris, J.C., Growdon, J.H., and Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491-4500.
- Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.
- Goodman, R.H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-1577.
- Govindarajan, A., Rao, B.S., Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S., and Chattarji, S. (2006). Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13208-13213.
- Graff, J., and Mansuy, I.M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res* 192, 70-87.
- Graff, J., and Mansuy, I.M. (2009). Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci* 30, 1-8.
- Green, K.N., Steffan, J.S., Martinez-Coria, H., Sun, X., Schreiber, S.S., Thompson, L.M., and LaFerla, F.M. (2008). Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *J Neurosci* 28, 11500-11510.
- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Grozinger, C.M., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4868-4873.
- Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., *et al.* (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55-60.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D., and Kandel, E.R. (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111, 483-493.
- Guardiola, A.R., and Yao, T.P. (2002). Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem* 277, 3350-3356.
- Guarente, L. (2000). Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* 14, 1021-1026.
- Guo, H., Albrecht, S., Bourdeau, M., Petzke, T., Bergeron, C., and LeBlanc, A.C. (2004). Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165, 523-531.
- Guo, J.P., Arai, T., Miklossy, J., and McGeer, P.L. (2006). Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1953-1958.

- Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., and Lubin, F.D. (2010). Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* 30, 3589-3599.
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., and McGaugh, J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J Neurosci* 21, 5089-5098.
- Haettig, J., Stefanko, D.P., Multani, M.L., Figueroa, D.X., McQuown, S.C., and Wood, M.A. (2011). HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem* 18, 71-79.
- Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2001). Cellular imaging of *zif268* expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21, 2186-2193.
- Hallam, T.M., and Bourtchouladze, R. (2006). Rubinstein-Taybi syndrome: molecular findings and therapeutic approaches to improve cognitive dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 63, 1725-1735.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503.
- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11, 682-696.
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Cruzalegui, F.H., and Bading, H. (1999). Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels. *Neuron* 22, 789-798.
- Harris, E.W., Ganong, A.H., and Cotman, C.W. (1984). Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 323, 132-137.
- Harris, K.M., Fiala, J.C., and Ostroff, L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 745-748.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I.B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., and Evans, D.A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60, 1119-1122.
- Heneka, M.T., and O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184, 69-91.
- Herdegen, T., and Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28, 370-490.

- Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., and Horio, Y. (2005). Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2alpha). *J Pharmacol Sci* 98, 200-204.
- Hock, C.H., Heese, K., Olivieri, G., Hulette, C.H., Rosenberg, C., Nitsch, R.M., and Otten, U. (2000). Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 59, 171-174.
- Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26, 5528-5540.
- Hofer, S.B., and Bonhoeffer, T. (2010). Dendritic spines: the stuff that memories are made of? *Curr Biol* 20, R157-159.
- Holsinger, R.M., Schnarr, J., Henry, P., Castelo, V.T., and Fahnestock, M. (2000). Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 347-354.
- Hong, W., Kim, A.Y., Ky, S., Rakowski, C., Seo, S.B., Chakravarti, D., Atchison, M., and Blobel, G.A. (2002). Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol* 22, 3729-3743.
- Hsieh, Y.J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R., and Roeder, R.G. (1999). The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 19, 7697-7704.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Sung, C.M., Liu, R., and Winkler, J. (2000). Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem* 275, 15254-15264.
- Hu, Y., Fisher, J.B., Koprowski, S., McAllister, D., Kim, M.S., and Lough, J. (2009). Homozygous disruption of the Tip60 gene causes early embryonic lethality. *Dev Dyn* 238, 2912-2921.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.
- Hughes, P., Beilharz, E., Gluckman, P., and Dragunow, M. (1993). Brain-derived neurotrophic factor is induced as an immediate early gene following N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neuroscience* 57, 319-328.
- Hughes, P., and Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47, 133-178.
- Huttenlocher, P.R. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res* 163, 195-205.

- Iizuka, M., and Stillman, B. (1999). Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 274, 23027-23034.
- Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R., and Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.
- Impey, S., Fong, A.L., Wang, Y., Cardinaux, J.R., Fass, D.M., Obrietan, K., Wayman, G.A., Storm, D.R., Soderling, T.R., and Goodman, R.H. (2002). Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron* 34, 235-244.
- Izumi, Y., Clifford, D.B., and Zorumski, C.F. (1991). 2-Amino-3-phosphonopropionate blocks the induction and maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 122, 187-190.
- Jahr, C.E., and Stevens, C.F. (1987). Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325, 522-525.
- Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996). MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 831-837.
- Janssen-Timmen, U., Lemaire, P., Mattei, M.G., Revelant, O., and Charnay, P. (1989). Structure, chromosome mapping and regulation of the mouse zinc-finger gene Krox-24; evidence for a common regulatory pathway for immediate-early serum-response genes. *Gene* 80, 325-336.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-153.
- Johnson, J.W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529-531.
- Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299.
- Jones, P.A., and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-1070.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.
- Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* 68, 1145-1155.
- Kalkhoven, E., Teunissen, H., Houweling, A., Verrijzer, C.P., and Zantema, A. (2002). The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain. *Mol Cell Biol* 22, 1961-1970.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216, 357-366.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.

- Kao, H.Y., Verdel, A., Tsai, C.C., Simon, C., Juguilon, H., and Khochbin, S. (2001). Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem* 276, 47496-47507.
- Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-391.
- Karamouzis, M.V., Papadas, T., Varakis, I., Sotiropoulou-Bonikou, G., and Papavassiliou, A.G. (2002). Induction of the CBP transcriptional co-activator early during laryngeal carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 128, 135-140.
- Karlic, R., Chung, H.R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., and Vingron, M. (2010). Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2926-2931.
- Karp, A., Paillard-Borg, S., Wang, H.X., Silverstein, M., Winblad, B., and Fratiglioni, L. (2006). Mental, physical and social components in leisure activities equally contribute to decrease dementia risk. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21, 65-73.
- Katsumoto, T., Yoshida, N., and Kitabayashi, I. (2008). Roles of the histone acetyltransferase monocytic leukemia zinc finger protein in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci* 99, 1523-1527.
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1, 911-917.
- Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt, J.D., and Rumbaugh, G. (2009). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 870-880.
- Kim, H.S., Kim, E.M., Kim, N.J., Chang, K.A., Choi, Y., Ahn, K.W., Lee, J.H., Kim, S., Park, C.H., and Suh, Y.H. (2004). Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 75, 117-124.
- Kim, S.H., Kang, H.J., Na, H., and Lee, M.O. (2010). Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein. *Breast Cancer Res* 12, R22.
- Kimura, A., and Horikoshi, M. (1998). Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* 3, 789-800.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Berezovska, O., and Hyman, B.T. (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem* 277, 28530-28536.
- Kitabayashi, I., Aikawa, Y., Yokoyama, A., Hosoda, F., Nagai, M., Kakazu, N., Abe, T., and Ohki, M. (2001). Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation. *Leukemia* 15, 89-94.
- Knoepfler, P.S., and Eisenman, R.N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.

- Korzus, E., Rosenfeld, M.G., and Mayford, M. (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42, 961-972.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.
- Koshibu, K., Graff, J., Beullens, M., Heitz, F.D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., and Mansuy, I.M. (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* 29, 13079-13089.
- Koshibu, K., Graff, J., and Mansuy, I.M. (2011). Nuclear protein phosphatase-1: an epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation. *Neuroscience* 173, 30-36.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kozikowski, A.P., Chen, Y., Gaysin, A., Chen, B., D'Annibale, M.A., Suto, C.M., and Langley, B.C. (2007). Functional differences in epigenetic modulators-superiority of mercaptoacetamide-based histone deacetylase inhibitors relative to hydroxamates in cortical neuron neuroprotection studies. *J Med Chem* 50, 3054-3061.
- Kramer, D., and Minichiello, L. (2010). Cell culture of primary cerebellar granule cells. *Methods Mol Biol* 633, 233-239.
- Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., *et al.* (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* 22, 3411-3420.
- Krug, M., Lossner, B., and Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13, 39-42.
- Kruszewski, M., and Szumiel, I. (2005). Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage--facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)* 4, 1306-1313.
- Kundu, T.K., Wang, Z., and Roeder, R.G. (1999). Human TFIIIC relieves chromatin-mediated repression of RNA polymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 19, 1605-1615.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., and Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509.
- Lagnaoui, R., Begaud, B., Moore, N., Chaslerie, A., Fourrier, A., Letenneur, L., Dartigues, J.F., and Moride, Y. (2002). Benzodiazepine use and risk of dementia: a nested case-control study. *J Clin Epidemiol* 55, 314-318.
- Lah, S., and Miller, L. (2008). Effects of temporal lobe lesions on retrograde memory: a critical review. *Neuropsychol Rev* 18, 24-52.

- Lahiri, D.K., Maloney, B., Basha, M.R., Ge, Y.W., and Zawia, N.H. (2007). How and when environmental agents and dietary factors affect the course of Alzheimer's disease: the "LEARN" model (latent early-life associated regulation) may explain the triggering of AD. *Curr Alzheimer Res* 4, 219-228.
- Lambert, J.C., and Amouyel, P. (2007). Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* 32 *Suppl 1*, S62-70.
- Lanahan, A., and Worley, P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70, 37-43.
- Langley, B., Gensert, J.M., Beal, M.F., and Ratan, R.R. (2005). Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4, 41-50.
- Laske, C., Stransky, E., Leyhe, T., Eschweiler, G.W., Maetzler, W., Wittorf, A., Soekadar, S., Richartz, E., Koehler, N., Bartels, M., *et al.* (2007). BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res* 41, 387-394.
- Lassar, A.B., Martin, P.L., and Roeder, R.G. (1983). Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science* 222, 740-748.
- Lauterborn, J.C., Rivera, S., Stinis, C.T., Hayes, V.Y., Isackson, P.J., and Gall, C.M. (1996). Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters. *J Neurosci* 16, 7428-7436.
- Lee, J., and Ryu, H. (2010). Epigenetic modification is linked to Alzheimer's disease: is it a maker or a marker? *BMB Rep* 43, 649-655.
- Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Lehrmann, H., Pritchard, L.L., and Harel-Bellan, A. (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* 86, 41-65.
- Lemaire, P., Vesque, C., Schmitt, J., Stunnenberg, H., Frank, R., and Charnay, P. (1990). The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 10, 3456-3467.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4, 481-495.
- Levenson, J.M., O'Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., and Sweatt, J.D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279, 40545-40559.
- Levenson, J.M., Roth, T.L., Lubin, F.D., Miller, C.A., Huang, I.C., Desai, P., Malone, L.M., and Sweatt, J.D. (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281, 15763-15773.

- Levenson, J.M., and Sweatt, J.D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6, 108-118.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., *et al.* (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Lithell, H., Hansson, L., Skoog, I., Elmfeldt, D., Hofman, A., Olofsson, B., Trenkwalder, P., and Zanchetti, A. (2003). The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 21, 875-886.
- Liu, X., Wang, L., Zhao, K., Thompson, P.R., Hwang, Y., Marmorstein, R., and Cole, P.A. (2008). The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* 451, 846-850.
- Liu, Y.Z., Chrivia, J.C., and Latchman, D.S. (1998). Nerve growth factor up-regulates the transcriptional activity of CBP through activation of the p42/p44(MAPK) cascade. *J Biol Chem* 273, 32400-32407.
- Liu, Y.Z., Thomas, N.S., and Latchman, D.S. (1999). CBP associates with the p42/p44 MAPK enzymes and is phosphorylated following NGF treatment. *Neuroreport* 10, 1239-1243.
- Losi, G., Puia, G., Braghiroli, D., and Baraldi, M. (2004). IDRA-21, a positive AMPA receptor modulator, inhibits synaptic and extrasynaptic NMDA receptor mediated events in cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 46, 1105-1113.
- Lu, Y., Christian, K., and Lu, B. (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89, 312-323.
- Lubin, F.D., Roth, T.L., and Sweatt, J.D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28, 10576-10586.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., and Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305, 719-721.
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., and Barker, J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519-522.
- Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M., and Scambler, P.J. (1998). HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet* 20, 74-77.
- Maharana, C., Sharma, K.P., and Sharma, S.K. (2010). Depolarization induces acetylation of histone H2B in the hippocampus. *Neuroscience* 167, 354-360.
- Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.
- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285, 1870-1874.

- Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R.W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* *245*, 862-866.
- Maquet, P., Matarazzo, L., Foret, A., Mascetti, L., Bourdieu, A.S., and Muto, V. (2010). [Contribution of sleep to learning and memory]. *Biol Aujourd'hui* *204*, 139-143.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W.K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* *1*, 194-202.
- Marks, P.A., Richon, V.M., and Rifkind, R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* *92*, 1210-1216.
- Marmigere, F., Rage, F., and Tapia-Arancibia, L. (2001). Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons. *J Neurosci Res* *66*, 377-389.
- Marmorstein, R. (2004). Structure and chemistry of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochem Soc Trans* *32*, 904-909.
- Marmorstein, R., and Roth, S.Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 155-161.
- Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 838-849.
- Martinez-Balbas, M.A., Bannister, A.J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J* *17*, 2886-2893.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., and Sun, Y.E. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* *302*, 890-893.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M.I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* *275*, 10887-10892.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside, C., Coleman, P.D., and Rogers, J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging* *31*, 2025-2037.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* *21*, 6820-6831.
- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 120-129.
- Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Celerier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., *et al.* (2008). Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacology* *33*, 1584-1602.
- Mayer, M.L., and Vyklicky, L., Jr. (1989). The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *J Physiol* *415*, 351-365.

- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28, 197-276.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.
- McDonald, R.J., King, A.L., Wasiak, T.D., Zelinski, E.L., and Hong, N.S. (2007). A complex associative structure formed in the mammalian brain during acquisition of a simple visual discrimination task: dorsolateral striatum, amygdala, and hippocampus. *Hippocampus* 17, 759-774.
- McGahon, B., Maguire, C., Kelly, A., and Lynch, M.A. (1999). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid and trans-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate impacts on long-term potentiation in the dentate gyrus in the rat: analysis of age-related changes. *Neuroscience* 90, 1167-1175.
- McGaugh, J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.
- McGaughy, J., Kaiser, T., and Sarter, M. (1996). Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. *Behav Neurosci* 110, 247-265.
- McGuinness, N., Anwyl, R., and Rowan, M. (1991). The effects of trans-ACPD on long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuroreport* 2, 688-690.
- McKay, J.A., Williams, E.A., and Mathers, J.C. (2004). Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans* 32, 1006-1007.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2000). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14400-14405.
- McQuown, S.C., Barrett, R.M., Matheos, D.P., Post, R.J., Rogge, G.A., Alenghat, T., Mullican, S.E., Jones, S., Rusche, J.R., Lazar, M.A., *et al.* (2011). HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* 31, 764-774.
- Medina, J.H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., and Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res* 192, 61-69.
- Mellor, J. (2006). Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet* 22, 320-329.
- Miller, C.A., Campbell, S.L., and Sweatt, J.D. (2008). DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 89, 599-603.
- Miller, C.A., and Sweatt, J.D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857-869.
- Miller, T.A., Witter, D.J., and Belvedere, S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 46, 5097-5116.
- Milner, B., Squire, L.R., and Kandel, E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.

- Mioduszevska, B., Jaworski, J., and Kaczmarek, L. (2003). Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system--a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J Neurochem* 87, 1313-1320.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Montarolo, P.G., Kandel, E.R., and Schacher, S. (1988). Long-term heterosynaptic inhibition in Aplysia. *Nature* 333, 171-174.
- Montminy, M., Koo, S.H., and Zhang, X. (2004). The CREB family: key regulators of hepatic metabolism. *Ann Endocrinol (Paris)* 65, 73-75.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.
- Muller, D., Joly, M., and Lynch, G. (1988). Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 242, 1694-1697.
- Muller, D., Nikonenko, I., Jourdain, P., and Alberi, S. (2002). LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med* 2, 605-611.
- Munton, R.P., Vizi, S., and Mansuy, I.M. (2004). The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett* 567, 121-128.
- Murer, M.G., Boissiere, F., Yan, Q., Hunot, S., Villares, J., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., and Raisman-Vozari, R. (1999). An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88, 1015-1032.
- Murray, K.D., Gall, C.M., Jones, E.G., and Isackson, P.J. (1994). Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase messenger RNA expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 60, 37-48.
- Muzzio, I.A., Kentros, C., and Kandel, E. (2009). What is remembered? Role of attention on the encoding and retrieval of hippocampal representations. *J Physiol* 587, 2837-2854.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Neish, A.S., Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Wei, W., and Parvin, J.D. (1998). Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* 26, 847-853.
- Nellgard, B., and Wieloch, T. (1992). Posts ischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 2-11.

- Neuwald, A.F., and Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* 22, 154-155.
- Nguyen, L., Humbert, S., Saudou, F., and Chariot, A. (2010). Elongator - an emerging role in neurological disorders. *Trends Mol Med* 16, 1-6.
- Nguyen, P.V., and Kandel, E.R. (1996). A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci* 16, 3189-3198.
- Nicolas, E., Morales, V., Magnaghi-Jaulin, L., Harel-Bellan, A., Richard-Foy, H., and Trouche, D. (2000). RbAp48 belongs to the histone deacetylase complex that associates with the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 275, 9797-9804.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T., Kaname, T., Noda, Y., Suzuki, M., Yasue, H., Nabeshima, T., Araki, K., and Yamamura, K. (1999). Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet* 8, 387-396.
- Oliveira, A.M., Abel, T., Brindle, P.K., and Wood, M.A. (2006). Differential role for CBP and p300 CREB-binding domain in motor skill learning. *Behav Neurosci* 120, 724-729.
- Oliveira, A.M., Wood, M.A., McDonough, C.B., and Abel, T. (2007). Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. *Learn Mem* 14, 564-572.
- Olivieri, G., Otten, U., Meier, F., Baysang, G., Dimitriades-Schmutz, B., Muller-Spahn, F., and Savaskan, E. (2003). Beta-amyloid modulates tyrosine kinase B receptor expression in SHSY5Y neuroblastoma cells: influence of the antioxidant melatonin. *Neuroscience* 120, 659-665.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Paganini-Hill, A., and Henderson, V.W. (1994). Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 140, 256-261.
- Palmer, A.M. (2002). Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 23, 426-433.
- Pang, P.T., and Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 3, 407-430.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487-491.

- Panteleeva, I., Rouaux, C., Larmet, Y., Boutillier, S., Loeffler, J.P., and Boutillier, A.L. (2004). HDAC-3 participates in the repression of e2f-dependent gene transcription in primary differentiated neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 656-660.
- Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39-47.
- Papadia, S., Soriano, F.X., Leveille, F., Martel, M.A., Dakin, K.A., Hansen, H.H., Kaindl, A., Sifringer, M., Fowler, J., Stefovskaja, V., *et al.* (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11, 476-487.
- Parent, M.B., and Baxter, M.G. (2004). Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11, 9-20.
- Parihar, M.S., and Hemnani, T. (2004). Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci* 11, 456-467.
- Parker, A.J., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., and Neri, C. (2005). [Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons]. *Med Sci (Paris)* 21, 556-557.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., *et al.* (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328, 753-756.
- Pelletier, G., Stefanovsky, V.Y., Faubladiere, M., Hirschler-Laszkiewicz, I., Savard, J., Rothblum, L.I., Cote, J., and Moss, T. (2000). Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol Cell* 6, 1059-1066.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., and Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421.
- Pennanen, C., Kivipelto, M., Tuomainen, S., Hartikainen, P., Hanninen, T., Laakso, M.P., Hallikainen, M., Vanhanen, M., Nissinen, A., Helkala, E.L., *et al.* (2004). Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging* 25, 303-310.
- Perera, T.D., Coplan, J.D., Lisanby, S.H., Lipira, C.M., Arif, M., Carpio, C., Spitzer, G., Santarelli, L., Scharf, B., Hen, R., *et al.* (2007). Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci* 27, 4894-4901.
- Persengiev, S.P., and Green, M.R. (2003). The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis* 8, 225-228.
- Petrij, F., Giles, R.H., Dauwerse, H.G., Saris, J.J., Hennekam, R.C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G.J., Goodman, R.H., Peters, D.J., *et al.* (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376, 348-351.
- Pflum, M.K., Tong, J.K., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem* 276, 47733-47741.

- Phillips, H.S., Hains, J.M., Armanini, M., Laramée, G.R., Johnson, S.A., and Winslow, J.W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Pillai, A. (2008). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals* 16, 183-193.
- Pin, J.P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A.S., Liu, J., Galvez, T., Acher, F., Rondard, P., and Prezeau, L. (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell* 96, 335-342.
- Pittenger, C., and Kandel, E.R. (2003). In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 757-763.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kiyin, M., and Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3, 238-244.
- Razin, A., and Riggs, A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166-2172.
- Reissner, K.J., Shobe, J.L., and Carew, T.J. (2006). Molecular nodes in memory processing: insights from Aplysia. *Cell Mol Life Sci* 63, 963-974.
- Remiszewski, S.W. (2002). Recent advances in the discovery of small molecule histone deacetylase inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5, 487-499.
- Reul, J.M., and Chandramohan, Y. (2007). Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1, S21-25.
- Reul, J.M., Hesketh, S.A., Collins, A., and Mécinas, M.G. (2009). Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* 4, 434-439.
- Reymann, K.G., and Matthies, H. (1989). 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively eliminates late phases of long-term potentiation in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 98, 166-171.
- Rich, J.B., Rasmusson, D.X., Folstein, M.F., Carson, K.A., Kawas, C., and Brandt, J. (1995). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 51-55.
- Richardson, C.L., Tate, W.P., Mason, S.E., Lawlor, P.A., Dragunow, M., and Abraham, W.C. (1992). Correlation between the induction of an immediate early gene, *zif/268*, and long-term potentiation in the dentate gyrus. *Brain Res* 580, 147-154.

- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Perez-Mediavilla, A., Frechilla, D., Del Rio, J., and Garcia-Osta, A. (2009). Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* 34, 1721-1732.
- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Marco, S., Perez-Otano, I., and Garcia-Osta, A. (2010). Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*.
- Riggs, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J.R., and Ingram, V.M. (1977). n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268, 462-464.
- Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., and Huganir, R.L. (1996). Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16, 1179-1188.
- Rock, D.M., and Macdonald, R.L. (1992). The polyamine diaminodecane (DA-10) produces a voltage-dependent flickery block of single NMDA receptor channels. *Neurosci Lett* 144, 111-115.
- Rodrigue, K.M., and Raz, N. (2004). Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *J Neurosci* 24, 956-963.
- Rodriguez-Moreno, A., and Sihra, T.S. (2007). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem* 103, 2121-2135.
- Roosendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S.M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D.P., Haettig, J., and Wood, M.A. (2010). Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 30, 5037-5046.
- Rosen, J.B., Fanselow, M.S., Young, S.L., Sitcoske, M., and Maren, S. (1998). Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res* 796, 132-142.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Rouaux, C., Jokic, N., Mbebi, C., Boutillier, S., Loeffler, J.P., and Boutillier, A.L. (2003). Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J* 22, 6537-6549.
- Rouaux, C., Loeffler, J.P., and Boutillier, A.L. (2004). Targeting CREB-binding protein (CBP) loss of function as a therapeutic strategy in neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 68, 1157-1164.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., Menger, Y., Boutillier, A.L., and Loeffler, J.P. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 27, 5535-5545.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25, 269-277.

- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., *et al.* (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38, 24-26.
- Rubinstein, J.H., and Taybi, H. (1963). Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child* 105, 588-608.
- Saha, R.N., Ghosh, A., Palencia, C.A., Fung, Y.K., Dudek, S.M., and Pahan, K. (2009). TNF- α preconditioning protects neurons via neuron-specific up-regulation of CREB-binding protein. *J Immunol* 183, 2068-2078.
- Saha, R.N., and Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* 13, 539-550.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Salminen, A., Tapiola, T., Korhonen, P., and Suuronen, T. (1998). Neuronal apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Brain Res Mol Brain Res* 61, 203-206.
- Santos-Rosa, H., Valls, E., Kouzarides, T., and Martinez-Balbas, M. (2003). Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acids Res* 31, 4285-4292.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M., and Tymianski, M. (1998). Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71, 2349-2364.
- Saura, C.A., Choi, S.Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., 3rd, Kandel, E.R., Duff, K., *et al.* (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 42, 23-36.
- Scatton, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol* 7, 389-400.
- Schindowski, K., Belarbi, K., and Buee, L. (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7 *Suppl* 1, 43-56.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schlingensiepen, K.H., Luno, K., and Brysch, W. (1991). High basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layers IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum--an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 122, 67-70.
- Schweigreiter, R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* 28, 583-594.
- Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11-21.
- Selvi, B.R., Cassel, J.C., Kundu, T.K., and Boutillier, A.L. (2010). Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1799, 840-853.

- Selvi, B.R., Jagadeesan, D., Suma, B.S., Nagashankar, G., Arif, M., Balasubramanyam, K., Eswaramoorthy, M., and Kundu, T.K. (2008). Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo. *Nano Lett* 8, 3182-3188.
- Sen, N., Hara, M.R., Kornberg, M.D., Cascio, M.B., Bae, B.I., Shahani, N., Thomas, B., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Snyder, S.H., *et al.* (2008). Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 10, 866-873.
- Shadlen, M.F., Siscovick, D., Fitzpatrick, A.L., Dulberg, C., Kuller, L.H., and Jackson, S. (2006). Education, cognitive test scores, and black-white differences in dementia risk. *J Am Geriatr Soc* 54, 898-905.
- Sharma, S.K. Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 1234-1240.
- Sharma, S.K., and Carew, T.J. (2004). The roles of MAPK cascades in synaptic plasticity and memory in Aplysia: facilitatory effects and inhibitory constraints. *Learn Mem* 11, 373-378.
- Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-861.
- Sheardown, M.J., Suzdak, P.D., and Nordholm, L. (1993). AMPA, but not NMDA, receptor antagonism is neuroprotective in gerbil global ischaemia, even when delayed 24 h. *Eur J Pharmacol* 236, 347-353.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shi, D., Pop, M.S., Kulikov, R., Love, I.M., Kung, A.L., and Grossman, S.R. (2009). CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16275-16280.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., and Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20, 727-740.
- Shinoda, S., Schindler, C.K., Meller, R., So, N.K., Araki, T., Yamamoto, A., Lan, J.Q., Taki, W., Simon, R.P., and Henshall, D.C. (2004). Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. *J Clin Invest* 113, 1059-1068.
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., and Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148.
- Simpson, C.L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W.J., Hansen, V.K., van Vught, P.W., Landers, J.E., Sapp, P., Van Den Bosch, L., Knight, J., *et al.* (2009). Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum Mol Genet* 18, 472-481.
- Slaugenhaupt, S.A., Blumenfeld, A., Gill, S.P., Leyne, M., Mull, J., Cuajungco, M.P., Liebert, C.B., Chadwick, B., Idelson, M., Reznik, L., *et al.* (2001). Tissue-specific expression of a

- splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 68, 598-605.
- Sleiman, S.F., Basso, M., Mahishi, L., Kozikowski, A.P., Donohoe, M.E., Langley, B., and Ratan, R.R. (2009). Putting the 'HAT' back on survival signalling: the promises and challenges of HDAC inhibition in the treatment of neurological conditions. *Expert Opin Investig Drugs* 18, 573-584.
- Small, G.W., Rabins, P.V., Barry, P.P., Buckholtz, N.S., DeKosky, S.T., Ferris, S.H., Finkel, S.I., Gwyther, L.P., Khachaturian, Z.S., Lebowitz, B.D., *et al.* (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* 278, 1363-1371.
- Soderling, T.R., and Derkach, V.A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23, 75-80.
- Soutoglou, E., Viollet, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M., and Talianidis, I. (2001). Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J* 20, 1984-1992.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., *et al.* (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.
- Squatrito, M., Gorrini, C., and Amati, B. (2006). Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol* 16, 433-442.
- Squire, L.R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61, 6-9.
- Squire, L.R., Knowlton, B., and Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44, 453-495.
- Stefanko, D.P., Barrett, R.M., Ly, A.R., Reolon, G.K., and Wood, M.A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9447-9452.
- Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., *et al.* (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.
- Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
- Stoub, T.R., Bulgakova, M., Leurgans, S., Bennett, D.A., Fleischman, D., Turner, D.A., and deToledo-Morrell, L. (2005). MRI predictors of risk of incident Alzheimer disease: a longitudinal study. *Neurology* 64, 1520-1524.
- Suganuma, T., Gutierrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2008). ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol* 15, 364-372.
- Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., *et al.* (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53, 37-43.

- Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Lin, A., Miura, M., and Suzuki, T. (2005). Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem* 280, 42364-42374.
- Sweatt, J.D. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76, 1-10.
- Sweatt, J.D. (2009). Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 65, 191-197.
- Swirnoff, A.H., and Milbrandt, J. (1995). DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 15, 2275-2287.
- Szekely, C.A., Breitner, J.C., Fitzpatrick, A.L., Rea, T.D., Psaty, B.M., Kuller, L.H., and Zandi, P.P. (2008). NSAID use and dementia risk in the Cardiovascular Health Study: role of APOE and NSAID type. *Neurology* 70, 17-24.
- Tanaka, Y., Naruse, I., Maekawa, T., Masuya, H., Shiroishi, T., and Ishii, S. (1997). Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10215-10220.
- Tang, Y., Holbert, M.A., Wurtele, H., Meeth, K., Rocha, W., Gharib, M., Jiang, E., Thibault, P., Verreault, A., Cole, P.A., *et al.* (2008). Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat Struct Mol Biol* 15, 738-745.
- Tanner, K.G., Trievel, R.C., Kuo, M.H., Howard, R.M., Berger, S.L., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Denu, J.M. (1999). Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* 274, 18157-18160.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998). Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709-726.
- Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., and Arancibia, S. (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 59, 201-220.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25, 77-107.
- Taunton, J., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.
- Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., Gianni, D., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Zambrano, N., Rosenfeld, M.G., and Russo, T. (2005). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep* 6, 77-82.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., *et al.* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25, 5455-5463.
- Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 61, 35-48.

- Terry, A.V., Jr., and Buccafusco, J.J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 821-827.
- Theuns, J., Brouwers, N., Engelborghs, S., Sleegers, K., Bogaerts, V., Corsmit, E., De Pooter, T., van Duijn, C.M., De Deyn, P.P., and Van Broeckhoven, C. (2006). Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 78, 936-946.
- Thiagalingam, S., Cheng, K.H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A., and Ponte, J.F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* 983, 84-100.
- Thompson, P.R., Wang, D., Wang, L., Fulco, M., Pediconi, N., Zhang, D., An, W., Ge, Q., Roeder, R.G., Wong, J., *et al.* (2004). Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* 11, 308-315.
- Tian, F., Hu, X.Z., Wu, X., Jiang, H., Pan, H., Marini, A.M., and Lipsky, R.H. (2009). Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J Neurochem* 109, 1375-1388.
- Tohgi, H., Utsugisawa, K., Nagane, Y., Yoshimura, M., Genda, Y., and Ukitsu, M. (1999). Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 70, 288-292.
- Tong, J.K. (2002). Dissecting histone deacetylase function. *Chem Biol* 9, 668-670.
- Tong, L., Balazs, R., Thornton, P.L., and Cotman, C.W. (2004). Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 24, 6799-6809.
- Tong, L., Thornton, P.L., Balazs, R., and Cotman, C.W. (2001). Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem* 276, 17301-17306.
- Torres, E.M., Perry, T.A., Blockland, A., Wilkinson, L.S., Wiley, R.G., Lappi, D.A., and Dunnet, S.B. (1994). Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience* 63, 95-122.
- Traissard, N., Herbeaux, K., Cosquer, B., Jeltsch, H., Ferry, B., Galani, R., Pernon, A., Majchrzak, M., and Cassel, J.C. (2007). Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 851-871.
- Traynelis, S.F., and Cull-Candy, S.G. (1990). Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 345, 347-350.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.

- Traynor, B.J., Bruijn, L., Conwit, R., Beal, F., O'Neill, G., Fagan, S.C., and Cudkowicz, M.E. (2006). Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 67, 20-27.
- Trievel, R.C., Rojas, J.R., Sterner, D.E., Venkataramani, R.N., Wang, L., Zhou, J., Allis, C.D., Berger, S.L., and Marmorstein, R. (1999). Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8931-8936.
- Tsai-Morris, C.H., Cao, X.M., and Sukhatme, V.P. (1988). 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res* 16, 8835-8846.
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53, 1-25.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70, 1-32.
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., and Pozzo-Miller, L.D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9, 224-237.
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L., and Tator, C.H. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 13, 2085-2104.
- Valor, L.M., Pulopulos, M.M., Jimenez-Minchan, M., Olivares, R., Lutz, B., and Barco, A. (2011). Ablation of CBP in Forebrain Principal Neurons Causes Modest Memory and Transcriptional Defects and a Dramatic Reduction of Histone Acetylation But Does Not Affect Cell Viability. *J Neurosci* 31, 1652-1663.
- Vaughn, J.E. (1989). Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* 3, 255-285.
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., *et al.* (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci* 27, 6128-6140.
- Vignes, M., and Collingridge, G.L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388, 179-182.
- Vigushin, D.M., and Coombes, R.C. (2002). Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 13, 1-13.
- Vina, J., and Lloret, A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 20 *Suppl* 2, S527-533.
- Vitolo, O.V., Sant'Angelo, A., Costanzo, V., Battaglia, F., Arancio, O., and Shelanski, M. (2002). Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13217-13221.

- Vo, N., and Goodman, R.H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276, 13505-13508.
- Voss, A.K., and Thomas, T. (2009). MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *Bioessays* 31, 1050-1061.
- Wang, Y.L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., and Martinez, E. (2008). Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* 283, 33808-33815.
- Waterhouse, E.G., and Xu, B. (2009). New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 42, 81-89.
- Wenk, G.L. (1997). The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem* 67, 85-95.
- Wenk, G.L., Stoehr, J.D., Quintana, G., Mobley, S., and Wiley, R.G. (1994). Behavioral, biochemical, histological, and electrophysiological effects of 192 IgG-saporin injections into the basal forebrain of rats. *J Neurosci* 14, 5986-5995.
- Wilson, R.S., Hebert, L.E., Scherr, P.A., Barnes, L.L., Mendes de Leon, C.F., and Evans, D.A. (2009). Educational attainment and cognitive decline in old age. *Neurology* 72, 460-465.
- Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3517-3522.
- Wisden, W., Errington, M.L., Williams, S., Dunnett, S.B., Waters, C., Hitchcock, D., Evan, G., Bliss, T.V., and Hunt, S.P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4, 603-614.
- Wittschieben, B.O., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C.D., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 4, 123-128.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wolozin, B., Wang, S.W., Li, N.C., Lee, A., Lee, T.A., and Kazis, L.E. (2007). Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Med* 5, 20.
- Wood, M.A., Attner, M.A., Oliveira, A.M., Brindle, P.K., and Abel, T. (2006). A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13, 609-617.
- Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M., Lombardi, T.L., and Abel, T. (2005). Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 12, 111-119.
- Wu, J.C., and Santi, D.V. (1985). On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Prog Clin Biol Res* 198, 119-129.

- Wu, J.C., and Santi, D.V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* 262, 4778-4786.
- Wu, X., Li, H., Park, E.J., and Chen, J.D. (2001). SMRTE inhibits MEF2C transcriptional activation by targeting HDAC4 and 5 to nuclear domains. *J Biol Chem* 276, 24177-24185.
- Wyrick, J.J., and Parra, M.A. (2009). The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: a genomic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1789, 37-44.
- Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-147.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M., and Evans, R.M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* 294, 2507-2511.
- Xu, W., Edmondson, D.G., and Roth, S.Y. (1998). Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* 18, 5659-5669.
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26, 5541-5552.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L.Y., and Covinsky, K. (2001). A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch Intern Med* 161, 1703-1708.
- Yamada, K., Mizuno, M., and Nabeshima, T. (2002). Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 70, 735-744.
- Yan, Q., Rosenfeld, R.D., Matheson, C.R., Hawkins, N., Lopez, O.T., Bennett, L., and Welcher, A.A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78, 431-448.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996a). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.
- Yang, W.M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996b). Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12845-12850.
- Yang, X.J. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32, 959-976.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M., and Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-372.
- Yao, Y.L., Yang, W.M., and Seto, E. (2001). Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol* 21, 5979-5991.
- Yeh, S.H., Lin, C.H., and Gean, P.W. (2004). Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol Pharmacol* 65, 1286-1292.

- Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. (1987). Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* 47, 3688-3691.
- Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70, 304-322.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257-263.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., and Breitner, J.C. (2002). Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288, 2123-2129.
- Zandi, P.P., Sparks, D.L., Khachaturian, A.S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K.A., and Breitner, J.C. (2005). Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry* 62, 217-224.
- Zanger, K., Radovick, S., and Wondisford, F.E. (2001). CREB binding protein recruitment to the transcription complex requires growth factor-dependent phosphorylation of its GF box. *Mol Cell* 7, 551-558.
- Zhang, C., and Saunders, A.J. (2007). Therapeutic targeting of the alpha-secretase pathway to treat Alzheimer's disease. *Discov Med* 7, 113-117.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., and Olson, E.N. (2002). Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 22, 7302-7312.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* 22, 1168-1179.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935.
- Zhou, X., Marks, P.A., Rifkind, R.A., and Richon, V.M. (2001). Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10572-10577.
- Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., *et al.* (2006). Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52, 255-269.
- Ziegenhorn, A.A., Schulte-Herbruggen, O., Danker-Hopfe, H., Malbranc, M., Hartung, H.D., Anders, D., Lang, U.E., Steinhagen-Thiessen, E., Schaub, R.T., and Hellweg, R. (2007). Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging* 28, 1436-1445.

ANNEXE

Article :

Histone deacetylase inhibitors: therapeutic agents and research tools for deciphering motor neuron diseases

Andoni Echaniz-Laguna, Olivier Bousiges, Jean-Philippe Loeffler, and Anne-Laurence Boutillier

Current Medicinal Chemistry 2008 ; 15(13):1263-73.