

UNIVERSITE DE STRASBOURG

ED 414 Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7237 Uds/CNRS

THESE

présentée pour l'obtention du grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité Neurosciences

par

Romain NEIDL

**Acétylation des histones au cours des processus de mémorisation :
influence du vieillissement et de l'environnement enrichi.**

Soutenue publiquement le 29 mars 2012

THÈSE dirigée par :

Mme BOUTILLIER Anne-Laurence

DR2, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme RAMPON Claire

DR2, Université de Toulouse

Mr. DAUPHIN François

Pr., Université de Caen

PRESIDENT DU JURY :

Mr. MENSAY-NYAGAN Ayikoe Guy

Pr., Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Jean-Philippe Loeffler, directeur de l'unité 'Signalisations moléculaires et neurodégénérescences' U692, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant la majeure partie de ma thèse.

Je remercie également le Docteur Christian Kelche, qui m'a permis de rejoindre le Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives au début de ma 3^e année de doctorat.

Un grand merci au Professeur Jean-Christophe Cassel, qui, par ses talents d'orateur, m'a largement emporté dans le domaine des Neurosciences cognitives.

Je remercie tout particulièrement les membres du jury, à savoir le Docteur Claire Rampon, le Professeur François Dauphin et le Professeur Ayikoe Guy Mensah Nyagan, d'avoir accepté de consacrer de leur temps pour juger mon travail de thèse.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères au Docteur Anne-Laurence Boutillier, ma directrice de thèse, qui m'a méticuleusement encadré et formé tout au long de ma thèse. Merci pour ta réflexion scientifique et ton enthousiasme sans faille, qui m'ont permis de toujours avancer dans ce travail et d'apprendre certaines valeurs essentielles dans le domaine de la recherche.

Un grand merci à mes collègues et 'potes' rencontrés au sein des deux laboratoires, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à collaborer mais aussi à passer quelques soirées. Cette aventure n'aurait jamais été aussi enrichissante sans votre présence. Merci à tous pour l'ambiance agréable et néanmoins studieuse qui règne dans ces deux laboratoires.

Un énorme merci également à tous mes amis « hors labo », qui ont fortement contribué au bon déroulement de ces quelques années de thèse. Promis, je serai un peu plus disponible ces prochains temps...

Enfin, je tiens bien évidemment à remercier ma petite famille, qui m'a toujours chaleureusement encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études.

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : MEMOIRE ET TRANSCRIPTION DE GÈNES.....	3
I- ‘Mémoires’ et mémoire spatiale	5
1. Classifications de la mémoire	5
1.1. Mémoire à court terme vs mémoire à long terme.....	6
1.2. Classification de la mémoire à long terme	7
2. Mémoire spatiale chez le Rongeur	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Théorie de la carte cognitive	8
2.3. Mémoire spatiale et hippocampe.....	9
2.3.1. Formation hippocampique.....	9
2.3.2. Rôle de l’hippocampe dans la mémoire spatiale	10
2.3.3. Evaluation de la mémoire spatiale chez le Rongeur	11
3. Consolidation synaptique et consolidation systémique.....	12
3.1. Consolidation synaptique de la mémoire	12
3.2. Consolidation systémique de la mémoire.....	13
II- Bases moléculaires de la mémoire	14
1. De la synapse à l’expression des gènes : potentialisation à long terme.....	14
1.1. Description générale de la LTP	14
1.2. LTP précoce et LTP tardive	15
1.3. Mécanismes moléculaires sous-tendant les processus de LTP	17
2. Facteurs de transcription impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire	21
2.1. CREB (<i>cAMP-responsive element binding protein</i>)	21
2.2. NF-κB (<i>Nuclear Factor kappa B</i>)	23
3. Présentation d’un gène de la mémoire : le <i>brain-derived neurotrophic factor</i> ...	26
3.1. BDNF, une neurotrophine particulière.....	26
3.2. BDNF et LTP	28
3.3. Implication du BDNF dans l’apprentissage et la mémoire	29
3.4. Régulation du gène codant le BDNF.....	31

CHAPITRE 2 : MÉCANISMES EPIGÉNÉTIQUES ET MÉMOIRE..... 35

I- Modifications épigénétiques et régulation de la transcription 37

1. Introduction générale..... 37

1.1. Définitions et terminologie..... 38

1.2. Structure de l'ADN 39

2. Méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones..... 41

2.1. Méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle 42

2.2. Différentes modifications post-traductionnelles des histones : quel but ? 44

2.2.1. Méthylation et phosphorylation des histones..... 45

2.2.2. Acétylation des histones 47

2.2.2.1. *Histones déacétylases (HDACs)*..... 48

2.2.2.2. *Histones acétyltransférases (HATs)* 48

2.2.2.2.a) *Présentation de PCAF, CBP et p300*..... 50

2.2.2.2.b) *Régulation fine de l'activité des HATs PCAF, CBP et p300* 52

II- Modifications épigénétiques, transcription de gènes et mémoire 53

1. Méthylation de l'ADN et processus mnésiques..... 53

1.1. Changements dynamiques de la méthylation de l'ADN dans l'encéphale adulte et consolidation de la mémoire 53

1.2. Méthylation de l'ADN et stockage à long terme de la mémoire 54

2. Acétylation des histones et consolidation de la mémoire 55

2.1. Implication des HATs dans les mécanismes de mémorisation 55

2.2. Acétylation des histones, plasticité synaptique et mémoire 59

2.3. Mémoire et modifications des histones sur 'les promoteurs' du *bdnf*..... 61

CHAPITRE 3 : VIEILLISSEMENT ET MEMOIRE 65

I- Impact du vieillissement sur les capacités mnésiques 67

1. Vieillissement et mémoire chez l'Homme..... 67

2. Vieillissement et mémoire chez le Rongeur..... 69

II- Bases cellulaires du vieillissement..... 73

1. Vieillissement et gliose réactionnelle..... 73

2. Vieillissement et neurotransmission : système cholinergique 74

3. Vieillissement et plasticité synaptique 77

4. Vieillessement et neurogène hippocampique.....	78
III- Bases moléculaires du vieillissement.....	83
1. Impact du vieillissement sur la transcription de gènes.....	83
2. Hypothèse épigénétique des atteintes mnésiques liées à l'âge	85
CHAPITRE 4 : ENVIRONNEMENT ENRICHI ET MEMOIRE	89
I- Notion d'environnement enrichi	92
II- Environnement enrichi et capacités mnésiques.....	94
1. Amélioration des capacités mnésiques par l'environnement enrichi	94
2. Mécanismes cellulaires mis en jeu par l'environnement enrichi	96
3. Mécanismes moléculaires mis en jeu par l'environnement enrichi	97
III- Environnement enrichi <i>versus</i> vieillissement	101
OBJECTIFS GENERAUX	105
CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THÈSE ET OBJECTIFS.....	107
CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE	111
ARTICLE 1	
<i>Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferases (Histone Acetyltransferases) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus</i>	113
Contexte scientifique et objectifs.....	117
Discussion	159
1. La consolidation de la mémoire spatiale entraîne une augmentation de l'expression de certaines HATs et de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal.	160
2. La consolidation de la mémoire spatiale est corrélée à une acétylation différentielle des histones.....	161
3. L'acétylation différentielle des histones est observée au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire.	164

ARTICLE 2

Late Environmental Enrichment Housing Conditions are Associated with Increased Histone Acetyltransferase Activity and Acetylated Chromatin Structure at Specific Enhancers in Brain-Derived Neurotrophic Factor Promoter I in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Memory..... **167**

Contexte scientifique et objectifs..... **171**

Matériel et Méthodes..... **175**

Animaux et conditions d'élevage 175

Evaluation de la mémoire spatiale en Piscine de Morris..... 175

Analyses statistiques (analyse comportementale) 177

Préparation des tissus 177

Extraction des ARN et PCR quantitative (RT-qPCR)..... 177

Préparation des protéines et analyses par western blot 178

Activité HAT 179

Immunoprécipitation de la chromatine..... 179

Immunohistochimie 180

Analyses statistiques (analyses moléculaires) 180

Résultats **185**

1. Evaluation de la mémoire spatiale de référence chez le Rat âgé de 24 mois après une exposition de 6 mois à un environnement enrichi..... 185

2. Effet des conditions d'élevage au niveau cellulaire 189

 2.1. *Effet de l'âge et des conditions d'élevage sur les marqueurs des cellules gliales et neuronales*..... 189

 2.2. *Impact de l'environnement enrichi sur la neurogénèse hippocampique adulte* 191

3. Démarche expérimentale pour les analyses moléculaires 193

4. Effet de l'environnement enrichi sur la voie des acétyltransférases 195

5. L'environnement enrichi entraîne une augmentation exon-spécifique de la transcription du *bdnf*..... 200

6. L'environnement enrichi ainsi que l'apprentissage entraînent une régulation site-spécifique de l'acétylation de H3 au niveau du promoteur du *bdnf-I* 201

7. L'environnement enrichi entraîne une augmentation de la phosphorylation des facteurs de transcription CREB et NF- κ B..... 207

Discussion	211
1. L'environnement enrichi entraîne une activation persistante de la voie des histones acétyltransférases (HATs) dans l'hippocampe dorsal de rats âgés.	212
2. L'environnement enrichi entraîne une augmentation persistante de la transcription du <i>bdnf</i> à partir de son promoteur-I <i>via</i> l'acétylation de H3.	214
3. L'augmentation de l'activité des facteurs de transcription CREB et NF-κB pourrait contribuer à l'amélioration des capacités mnésiques induite par l'environnement enrichi.....	216
 ARTICLE 3	
<i>Fine Tuning of H2B Histone Acetylation: in vitro by NMDA Receptor Activation and in vivo during Hippocampus-Dependent Memory Formation.....</i>	223
 Contexte scientifique et objectifs.....	227
 Conclusion	261
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	263
 I- Comment interpréter le 'langage' de la chromatine ?	265
1. Quelles histones ? Dans quel but ?	265
L'acétylation de l'histone H3 est un pré-requis favorable au processus de consolidation des souvenirs.....	265
Les acétylations des histones H2B et H4 constituent des marques épigénétiques spécifiquement impliquées dans la consolidation des souvenirs, <i>via</i> l'activation de programmes transcriptionnels particuliers.....	268
2. Plus d'acétylations d'histones pour de meilleures capacités mnésiques ?.....	269
 II- Epi-thérapie, vers quelle stratégie ?	271
1. Amélioration des capacités cognitives des rongeurs par un traitement aux inhibiteurs de HDACs.....	271
2. Le développement d'activateurs de HATs : vers une approche plus spécifique ?	273
 RÉFÉRENCES	275

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la succession des différents processus de la mémoire.	5
Figure 2 : Système de Mémoire à Long Terme et ses différents sous-systèmes.....	7
Figure 3 : Schéma simplifié de la circuiterie majoritaire de la région hippocampique.	10
Figure 4 : Schéma du dispositif expérimental du MWM.....	12
Figure 5 : Représentation des différentes phases de la LTP	16
Figure 6 : Mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique : exemple de la LTP.....	19
Figure 7 : Représentation schématique simplifiée du mode d'action de CREB dans la transcription des gènes.....	22
Figure 8 : Voie de l'activation de NF- κ B.....	24
Figure 9 : Voies de signalisation BDNF/TrkB.....	28
Figure 10 : Structure du gène du <i>brain-derived neurotrophic factor</i> (bdnf) chez le Rongeur.....	31
Figure 11 : Organisation du nucléosome	39
Figure 12 : Représentation des différents niveaux de compaction de l'ADN.....	40
Figure 13 : Représentation simplifiée des conformations de la structure de la chromatine....	41
Figure 14 : Réaction de méthylation de l'ADN	43
Figure 15 : Schéma représentatif de la coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones	44
Figure 16 : Illustration des modifications des 30 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 chez l'Homme	45
Figure 17 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la méthylation des histones.	46
Figure 18 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la phosphorylation des histones.	46
Figure 19 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la réaction d'acétylation des histones.	47

Figure 20 : Classification des différentes HATs en fonction de leur localisation nucléaire (type A) ou cytoplasmique (type B).....	49
Figure 21 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de PCAF.....	50
Figure 22 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de CBP.	51
Figure 23 : Tableau récapitulatif des déficits de plasticité et de mémoire à long terme observés dans différents modèles transgéniques pour CBP.	58
Figure 24 : Schéma hypothétique des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de la chromatine <i>via</i> l'acétylation des histones dans l'hippocampe, en réponse à un apprentissage.....	60
Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'axe HPA	71
Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'hypothèse du rôle des glucocorticoïdes dans la perte des fonctions hippocampiques liée au vieillissement	72
Figure 27 : Schéma indicatif de la localisation des noyaux cholinergiques de la base du cerveau antérieur chez le Rongeur ainsi que de leurs principales projections ...	75
Figure 28 : Bilan des altérations de la LTP observées chez le Rat âgé au niveau des synapses du gyrus denté et de CA1	77
Figure 29 : Neurogénèse hippocampique.....	79
Figure 30 : Schéma simplifié de l'implication de l'acétylation des histones dans les déficits de plasticité synaptique et de mémoire liés à l'âge chez le Rongeur. ...	87
Figure 31 : Représentation des conditions d'environnement enrichi.....	93
Figure 32 : Schéma illustrant l'interaction environnement enrichi/vieillessement	103
Figure 33 : Hypothèse de travail pour expliquer le maintien des capacités mnésiques par un environnement enrichi lors du vieillissement.....	109
Figure 34 : Tableau récapitulatif des principaux inhibiteurs de HDACs utilisés	273
Figure 35 : Comparaison des effets des traitements au VPA (HDACi) et au CSP-CTPB (activateur de HATs) sur les niveaux d'acétylation de H3 (H3K9K14) et H2B (H2BK5K12K15K20) dans l'hippocampe dorsal de rats	274

LISTE DES ABREVIATIONS

AcétylCoA	Acétyl coenzyme A
Ach	Acétylcholine
AchE	Acétylcholinestérase
ACTH	Adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Arc	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF-1	<i>Activating transcription factor</i>
BDB	Bande diagonale de Broca
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CA	Corne d'Ammon
CaM	Calmoduline
CaMK	Kinase dépendante de la calmoduline
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CE	Cortex entorhinal
CFC	<i>Contextual fear conditioning</i> ou Conditionnement de peur au contexte
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation ou Immunoprécipitation de la chromatine

CpG	Dinucléotide cytosine/guanine
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CREM	<i>cAMP-responsive element modulator</i>
CRH	Corticolibérine
DG	Gyrus denté
DNMTs	<i>DNA methyltransferases</i>
EE	Environnement enrichi
e-LTP	<i>Early LTP</i> ou Phase d'induction de la LTP
EPSPs	<i>Excitatory post synaptic potentials</i> ou Potentiels excitateurs post-synaptiques
GC	Glucocorticoïdes
GCL	Couche granulaire
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GR	Récepteurs aux glucocorticoïdes
HATs	<i>Histone acetyltransferases</i>
HDACi	Inhibiteurs de HDACs
HDACs	<i>Histone deacetylases</i>
HMTs	<i>Histone methyltransferases</i>
HFS	Stimulations à haute fréquence
HPA	<i>Hypothalamic pituitary adrenal axis</i>
IEG	<i>Immediate early gene</i> ou Gène précoce
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>

KID	<i>Kinase-inductible domain</i>
I-LTP	<i>Late LTP</i> ou Phase de maintenance de la LTP
LTP	<i>Long-term potentiation</i> ou Potentialisation à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK/Erk	<i>Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase</i>
MBPs	<i>Methyl-CpG binding proteins</i>
MeCP2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MR	Récepteurs aux minéralocorticoïdes
MSK1	<i>Mitogen- and stress-activated kinase 1</i>
MWM	<i>Morris Watermaze</i> ou Piscine de Morris
NaBut	Butyrate de sodium
NBM	Noyau basal magnocellulaire
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NRSE	<i>Neural-restrictive silencer element</i>
NRSF	<i>Neural-restrictive silencer factor</i>
NT3	Neurotrophine 3
NT4/5	Neurotrophine 4/5
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>

PKA/C	Protéines kinases A/C
PLCγ	Phospholipase C γ
PP1	Protéine phosphatase 1
PPs	Protéines phosphatases
SAH	S-adénosyl-homocystéine
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SGZ	<i>Sub-granular zone</i> ou Zone sous-granulaire du gyrus denté
SM	Septum médian
SNC	Système nerveux central
SVZ	<i>Sub-ventricular zone</i> ou Zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux
TrkB	<i>Tropomyosin-related kinase B</i>
TSA	Trichostatin A
VPA	<i>Valproic acid</i>

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1

MEMOIRE

ET

TRANSCRIPTION DE GENES

CHAPITRE 1

MEMOIRE ET TRANSCRIPTION DE GENES

I- 'Mémoires' et mémoire spatiale

La mémoire peut être définie comme l'ensemble des activités mentales qui permettent de stocker, maintenir, et restituer des informations. On peut la schématiser dans le temps comme une succession de différents processus. L'encodage permet l'acquisition des informations. Celles-ci sont ensuite consolidées, ce qui permet la stabilisation et le maintien de la trace mnésique. Enfin, le souvenir peut être rappelé à plus-ou-moins long terme (jours, mois, années) et être reconsolidé ou, au contraire, oublié (figure 1).

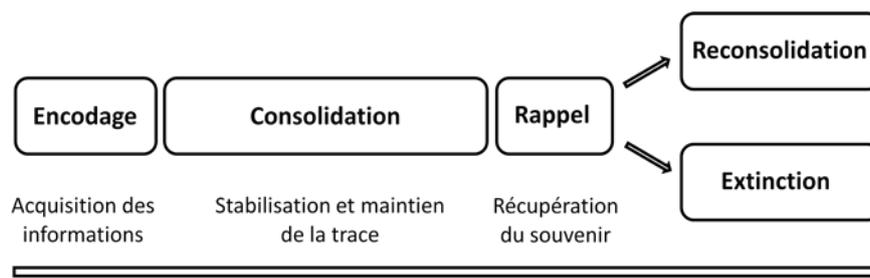


Figure 1 : Représentation schématique de la succession des différents processus de la mémoire.

1. Classifications de la mémoire

Lorsque l'on introduit les différents types de mémoire, il paraît nécessaire de parler de systèmes de mémoire. Un système se définit comme un réseau de neurones qui se spécialise

dans le traitement d'un type spécifique d'informations. Ces systèmes de mémoire vont se classer selon leur registre sensoriel (auditif, visuel), leur décours temporel (mémoire à court terme *vs* mémoire à long terme), le format des représentations mnésiques (mémoire déclarative *vs* non-déclarative) ou encore le mode de récupération de la trace (explicite *vs* implicite).

1.1. Mémoire à court terme *vs* mémoire à long terme

Une des notions les plus anciennes et surtout l'une des mieux acceptées en ce qui concerne la mémoire est la distinction entre mémoire à court terme et mémoire à long terme.

La mémoire à court terme est précédée de la mémoire sensorielle (ou registre sensoriel). Cette dernière est automatique et par conséquent ne nécessite aucune mobilisation de nos ressources attentionnelles. Elle résulte de nos capacités perceptives qui, généralement, s'évanouissent en moins d'une seconde (300-500ms). On peut la diviser en deux sous-groupes : la mémoire iconique (visuelle) et la mémoire échoïque (auditive). La mémoire sensorielle constitue un passage obligé pour la mémoire à court terme. La mémoire à court terme (immédiate ou primaire) va dépendre de l'attention portée aux éléments du registre sensoriel. Elle résulte d'une mobilisation des ressources attentionnelles pouvant aller de quelques secondes à quelques minutes. La mémoire à court terme joue un rôle particulier dans l'apprentissage de nouvelles informations. Elle va permettre une rétention temporaire de l'information en cours de traitement. Une extension plus récente du concept de mémoire à court terme est la mémoire de travail. Il s'agit d'un système de mémoire transitoire qui s'occupe à la fois du traitement et du maintien des informations à court terme (stockage temporaire). L'information est maintenue quelques secondes afin de permettre la manipulation des données nécessaires à la réalisation de la tâche en cours. Un bon exemple d'utilisation de la mémoire de travail est la traduction simultanée d'un interprète qui doit, à la fois, traduire et retenir les informations qui lui parviennent dans une autre langue. Lorsque l'information est pertinente et/ou répétée, elle peut alors être consolidée pour être maintenue dans le système de mémoire à long terme. Lors de ma thèse je me suis intéressé à cette phase de consolidation qui permet le passage de la mémoire à court terme vers la mémoire à long terme.

1.2. Classification de la mémoire à long terme

Au sein de la mémoire à long terme, on distingue d'une part la mémoire explicite (déclarative) et d'autre part la mémoire implicite (non-déclarative). Cette dernière est composée de la mémoire des « savoir-faire » (mémoire des habitudes et des habiletés motrices pouvant être acquises de manière inconsciente), mais aussi de l'apprentissage associatif (conditionnement) ainsi que de l'effet d'amorçage (augmentation de la perception de stimuli après une expérience récente avec ces mêmes stimuli) (Squire, 1993).

La mémoire déclarative, explicite, se subdivise chez l'Homme en une mémoire épisodique et une mémoire sémantique. La mémoire sémantique constitue le stockage des connaissances générales, des règles et des concepts d'un individu. Elle peut s'affranchir du contexte spatio-temporel de son acquisition. En ce qui concerne la mémoire épisodique, l'individu va au contraire mémoriser un évènement vécu avec l'ensemble de son contexte (spatial et temporel). Par ailleurs, la charge émotionnelle vécue par le sujet va conditionner la qualité de cette mémoire épisodique (figure 2).

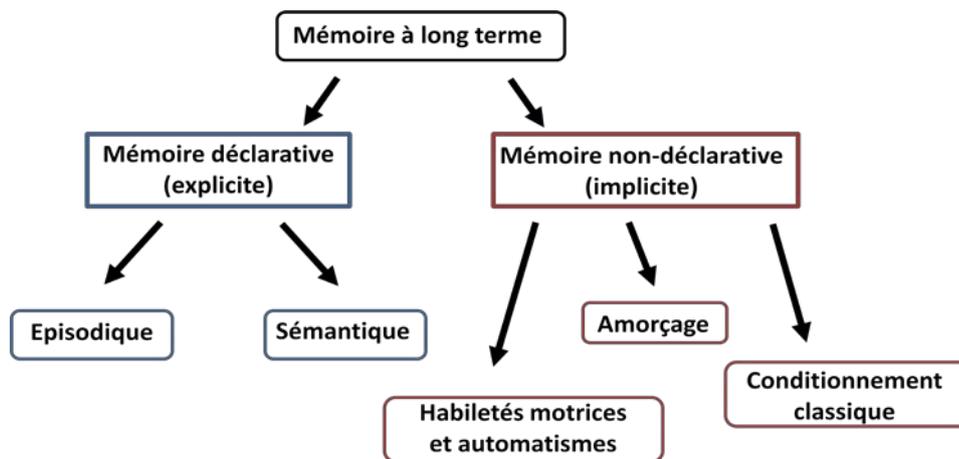


Figure 2 : Système de Mémoire à Long Terme et ses différents sous-systèmes (adaptée de Squire et Zola-Morgan, 1991).

Ces particularités de la mémoire déclarative chez l'Homme posent problème lorsque l'on essaie d'extrapoler ces définitions à l'animal. Compte tenu du fait que la mémoire déclarative est, par définition, verbalisable et consciente, il devient difficile de la modéliser chez l'animal. Par conséquent, chez l'animal on parle plutôt de mémoire de type épisodique

ou '*episodic-like*'. Un exemple de mémoire '*episodic-like*' particulièrement étudié chez le Rongeur est la mémoire spatiale. Il est intéressant de préciser que les structures cérébrales impliquées dans ce type de mémoire sont homologues chez l'Homme et le Rat (pour revue : Moser et Moser, 1998).

2. Mémoire spatiale chez le Rongeur

2.1. Définition

La mémoire spatiale permet de stocker, maintenir, et restituer des informations concernant l'environnement d'un individu, ainsi que son orientation spatiale dans cet environnement *via* des routes mais surtout des configurations (Kessels et coll., 2001). La capacité à s'orienter dans l'espace et ainsi de s'y déplacer étant essentielle à la survie (trouver de la nourriture, échapper à un prédateur), la mémoire spatiale se retrouve chez différentes espèces, dont le Rat qui constitue mon modèle d'étude. On peut étudier chez celui-ci la mémoire spatiale, qu'elle soit de travail ou de référence. Dans le cas de la mémoire spatiale de travail, il s'agit pour l'animal d'utiliser et de manipuler des informations spatiales sans pour autant qu'elles soient consolidées dans le système de mémoire à long terme. Au contraire, la mémoire spatiale de référence nécessite une consolidation des informations. C'est pourquoi, je me suis intéressé à cette dernière au cours de ma thèse.

2.2. Théorie de la carte cognitive

Il existe différentes stratégies pour se diriger dans un environnement. O'Keefe et Nadel (1978) distinguent deux stratégies majeures dans leur théorie de la carte cognitive. La première, dite allocentrique, implique essentiellement l'hippocampe. Cette stratégie nécessite la création de relations spatiales entre divers indices pour former une représentation mentale de l'environnement afin de pouvoir s'y déplacer. Cette représentation est caractérisée par une très grande flexibilité. L'individu va être capable de se rendre à l'emplacement visé, peu importe son point de départ (apprentissage de place (spatial)) (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Hartley et coll., 2003). La formation de cette carte spatiale ou cognitive lors de la stratégie allocentrique va faire intervenir des cellules particulières de l'hippocampe, les cellules de lieu,

capables de s'activer lorsque l'individu se trouve à un endroit précis de son environnement (O'Keefe et Dotrovsky, 1971 ; Muller et coll., 1987).

La seconde stratégie, dite égoцентриque, implique des structures extra-hippocampiques comme le striatum. Elle se base sur des informations relatives à la position du corps et à ses déplacements dans l'environnement. Ce système de navigation est dit 'de routes' (*taxon system*). Par exemple, pour aller de chez moi à la boulangerie, je prends la première à droite puis la deuxième à gauche. On peut ainsi atteindre un but en suivant la même route à chaque fois (apprentissage de réponse (procédural)). Cette stratégie est peu flexible. En effet, le simple changement de point de départ rend la stratégie caduque par rapport au but à atteindre.

2.3. Mémoire spatiale et hippocampe

2.3.1. Formation hippocampique

La région hippocampique est située dans le lobe temporal médian et est composée de structures bilatérales et symétriques. Elle est constituée de la formation hippocampique (hippocampe et subiculum) et de la région parahippocampique (cortex entorhinal, cortex périrhinal, présubiculum et parasubiculum). L'hippocampe étant une structure primitive et conservée de l'archicortex, son architecture est commune à différents espèces comme l'Homme, les Primates non-humains et le Rat.

En ce qui concerne son anatomie, l'hippocampe est constitué des 3 sous-régions de la corne d'Ammon (CA : CA1, CA2, CA3) et du gyrus denté (DG). La circuiterie majoritaire de la région hippocampique est une boucle trisynaptique (cortex entorhinal → DG → CA3 → CA1 → cortex entorhinal et subiculum) (figure 3). En effet, la principale source d'afférences vers l'hippocampe est le cortex entorhinal. Ses neurones projettent, *via* la voie perforante, sur les cellules granulaires du DG ainsi que sur les cellules pyramidales de CA3 et communiquent des informations concernant l'environnement en provenance des aires corticales associatives et sensorielles. Les cellules granulaires du DG projettent à leur tour vers CA3 par l'intermédiaire des fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 projettent alors vers CA1 *via* les collatérales de Schaffer. Il faut noter que la région CA1 peut également recevoir des informations en provenance directe du cortex entorhinal par la voie perforante (voie monosynaptique). En retour, les cellules pyramidales de CA1 projettent vers le cortex

entorhinal et le subiculum, qui constituent ainsi les principales efférences de l'hippocampe (pour revue : Van Strien et coll., 2009) (figure 3).

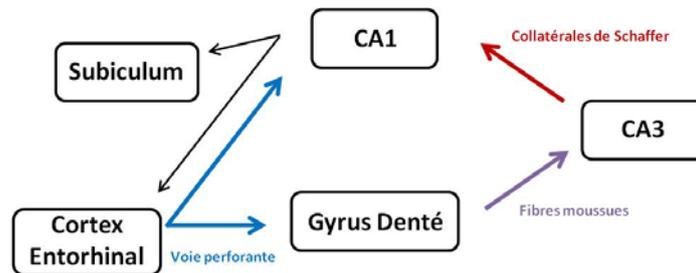


Figure 3 : Schéma simplifié de la circuiterie majoritaire de la région hippocampique. Les axones provenant du cortex entorhinal (voie perforante) projettent vers les cellules granulaires du gyrus denté (DG). Les axones des cellules granulaires du DG projettent vers CA3 *via* les fibres moussues. Les axones des cellules pyramidales de CA3 (Collatérales de Schaffer) projettent vers CA1, qui projette à son tour vers le Subiculum et le cortex entorhinal.

2.3.2. Rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale

Un grand nombre d'études utilisant différentes approches expérimentales (neuroanatomie, électrophysiologie, lésion, etc.) soulignent l'implication de l'hippocampe au niveau des processus d'apprentissage et de mémorisation spatiale.

Les études pionnières de Olton et collaborateurs mettent en évidence que des lésions de l'hippocampe entraînent des déficits de mémoire spatiale chez le Rongeur (Olton et coll., 1978). De même, en 1984, Morris et collaborateurs montrent que des lésions hippocampiques induisent un déficit d'apprentissage et de mémorisation spatiale dans un « labyrinthe aquatique » (Morris et coll., 1984). Celui-ci, nommé *Morris Watermaze* ou Piscine de Morris, est actuellement le test le plus couramment utilisé pour évaluer la mémoire spatiale chez le Rongeur (le principe de ce test sera décrit à la page 11 du manuscrit).

Ces déficits de mémoire spatiale ont été observés aussi bien chez le Rongeur après lésion de l'hippocampe que chez des sujets humains présentant des atteintes hippocampiques (Nunn et coll., 1998 ; Bohbot et coll., 2002 ; pour revue : Kesner et Hopkins, 2006). Par ailleurs, Maguire et collaborateurs ont montré grâce à l'imagerie par résonance magnétique que le volume de l'hippocampe postérieur de chauffeurs de taxi londoniens était supérieur à

celui de témoins exerçant une autre profession alors qu'à l'inverse, celui de l'hippocampe antérieur était diminué par rapport aux témoins. Ils ont de plus pu établir une corrélation entre le volume de l'hippocampe droit et le nombre d'années d'expérience de ces chauffeurs de taxi (Maguire et coll., 2000). L'ensemble de ces études souligne donc bien le rôle crucial de l'hippocampe dans les processus de navigation et la mémoire spatiale.

Chez le Rongeur, l'hippocampe peut au niveau fonctionnel être segmenté en 3 parties : l'hippocampe dorsal, intermédiaire et ventral. L'hippocampe dorsal, qui correspond à l'hippocampe postérieur chez l'Homme et les Primates non-humains, est particulièrement impliqué dans la mémoire spatiale au vu de l'ensemble des études comportementales, anatomiques et moléculaires disponibles (pour revue : Fanselow et Dong, 2010).

2.3.3. Evaluation de la mémoire spatiale chez le Rongeur :

Test de la piscine de Morris (*Morris Watermaze* : MWM)

Ma thèse ayant pour objectif de s'intéresser au processus de consolidation d'un souvenir dans le cadre de la mémoire spatiale de référence, nous avons choisi d'utiliser le test du MWM (figure 4). Ce test se base sur les aptitudes natatoires du Rat et sur son aversion pour l'eau fraîche. Le dispositif du test consiste en un bassin circulaire remplie d'eau opacifiée par l'ajout de lait en poudre. Une plate-forme 'refuge' immergée va être placée à un endroit précis de la piscine. L'objectif pour l'animal est donc de retrouver cette plate-forme le plus rapidement possible à l'aide d'indices distaux se trouvant dans la pièce d'expérimentation. Il faut noter que, dans ce test, il est possible d'évaluer différentes formes de mémoires spatiales selon le type de protocole utilisé (mémoire de travail *vs* de référence). Dans le cadre de la mémoire de référence qui m'intéresse plus particulièrement, la plate-forme reste positionnée au même endroit d'un essai à l'autre, seuls les points de lâcher varient. Pendant la phase d'apprentissage (ou acquisition), l'animal est lâché dans l'enceinte de la piscine, face à la paroi, et ce plusieurs fois par jour et d'un point de lâcher différent à chaque essai. Il doit alors retrouver la plate-forme en s'aidant des indices distaux présents dans la pièce. Un apprentissage classique dure plusieurs jours et se caractérise 'normalement' par une diminution marquée des paramètres de distance et de latence pour rejoindre la plate-forme. A la fin de cette période d'apprentissage, un test de rétention est réalisé pour évaluer la capacité de rappel de la localisation de la plate-forme. Lors de ce test, la plate-forme est

retirée et on laisse l'animal naviguer pendant un temps donné. Si l'animal a correctement retenu la localisation de la plate-forme, il nagera préférentiellement à l'endroit où celle-ci se trouvait initialement.

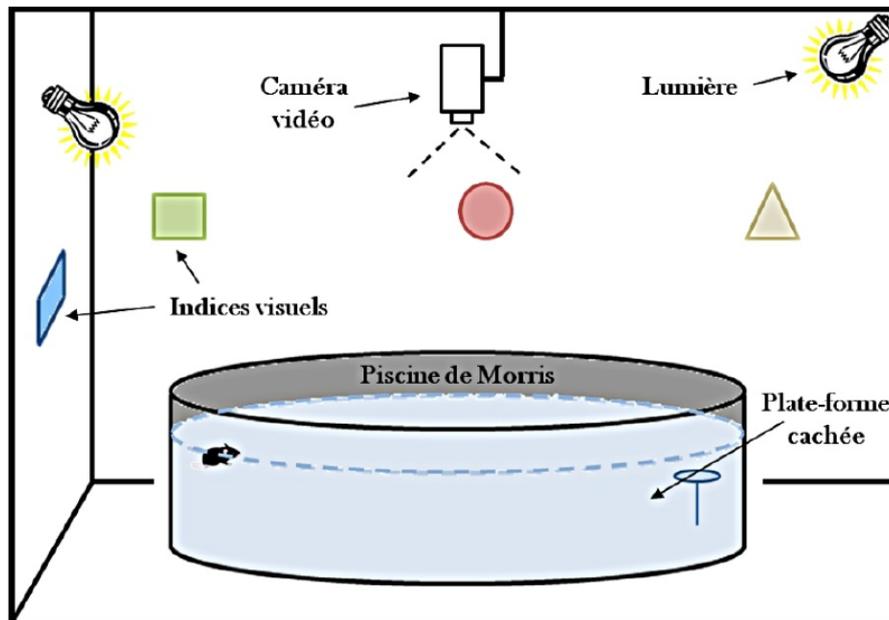


Figure 4 : Schéma du dispositif expérimental du MWM (adaptée de *Modélisation des déficits cognitifs de la maladie d'Alzheimer par une approche lésionnelle chez des souris transgéniques hAPP/hApoE et non transgéniques C57BL/6J*, Dr Moreau P.H., 2011).

3. Consolidation synaptique et consolidation systémique

3.1. Consolidation synaptique de la mémoire

La consolidation de la mémoire consiste au passage de la mémoire à court terme à la mémoire à long terme. D'un point de vue moléculaire, la mémoire à court terme est associée à des changements post-traductionnels de protéines préexistantes capables de modifier l'efficacité de la transmission synaptique (Kandel et coll., 1986). Il faut noter que ces modifications sont transitoires et instables, ce qui peut expliquer le caractère labile de la mémoire à court terme. Le passage vers une mémoire à long terme nécessite au contraire l'activation de voies de signalisation permettant une transcription de gènes et donc la synthèse de nouvelles protéines, ainsi que des changements morphologiques localisés au niveau des

synapses. Le processus de consolidation fait donc intervenir un dialogue étroit entre gènes et synapses (Kandel, 2001) qui aboutit à la production de modifications stables et persistantes pour permettre l'établissement de la mémoire à long terme : on parle de consolidation synaptique ou cellulaire (Engert et Bonhoeffer, 1999). Il est clair, maintenant, que ce type de consolidation apparaît dans l'hippocampe après un apprentissage spatial (pour revue : Bramham, 2007).

3.2. Consolidation systémique de la mémoire

Cette consolidation synaptique peut être suivie par un deuxième niveau de consolidation, la consolidation systémique, qui va permettre une persistance de la trace plus importante dans le temps. Celle-ci est due à la réorganisation graduelle de connexions entre et au sein des régions cérébrales qui sous-tendent la mémoire déclarative et non-déclarative. Différentes théories de la consolidation systémique sont décrites. Selon la théorie *standard*, l'expérience serait initialement encodée dans l'hippocampe et les circuits corticaux. Au cours du sommeil, une réactivation coordonnée de ces réseaux permettrait le renforcement graduel des connexions cortico-corticales. Ainsi, de nouveaux souvenirs deviendraient peu à peu indépendants de l'hippocampe et seraient graduellement intégrés aux souvenirs corticaux préexistants (Marr, 1970 ; Squire et Alvarez, 1995). En 2005, Rudy et collaborateurs proposent une version amendée de la théorie *standard* basée sur la force de la trace : que cette dernière soit récente ou non, c'est sa force qui impliquerait la mise en jeu du cortex préfrontal. En effet, un dialogue hippocampo-cortical serait nécessaire pour reconstruire une trace faible. Au contraire, d'après la théorie *de la trace multiple*, l'expérience serait initialement encodée dans des réseaux hippocampo-corticaux qui seraient réactivés lors de la phase de sommeil. Ceci engendrerait, à terme, la formation de multiples traces dans l'hippocampe et le cortex. Celles de l'hippocampe sous-tendraient le contexte spatio-temporel des souvenirs, alors que celles du cortex seraient de nature sémantique. L'hippocampe ne serait donc nécessaire qu'au rappel de souvenirs épisodiques contextuellement riches (Nadel et Moscovitch, 1997).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à l'implication des mécanismes susceptibles de réguler l'expression des gènes au niveau de l'hippocampe suite à un apprentissage spatial. Par conséquent, dans le reste du manuscrit, l'utilisation du terme 'consolidation' fera référence à la consolidation synaptique (ou cellulaire) de la mémoire.

II- Bases moléculaires de la mémoire

La plasticité cérébrale peut être définie comme la capacité de l'encéphale à moduler sa structure en réponse aux interactions entre un individu et son environnement, et induire ainsi des changements au niveau fonctionnel. Il est aujourd'hui bien accepté que tout apprentissage va induire des phénomènes de plasticité au niveau de l'encéphale. Comme nous l'avons vu précédemment, la consolidation d'un souvenir nécessite tout d'abord une phase de consolidation synaptique durant laquelle des processus de plasticité synaptique se mettent en place, puis une phase de consolidation systémique accompagnée par des remodelages structuraux des différents réseaux neuronaux activés suite à l'apprentissage.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à certains mécanismes de plasticité synaptique qui se mettent en place dans l'hippocampe suite à un apprentissage. Nous nous focaliserons plus particulièrement sur les voies de signalisation moléculaire majeures qui aboutissent à la transcription de gènes, permettant ainsi la consolidation synaptique.

1. De la synapse à l'expression des gènes :

Notion de potentialisation à long terme (LTP)

Les recherches sur les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des processus d'apprentissage et de mémorisation ont connu un essor important ces dernières années. Ceci est en grande partie dû à la découverte dans l'hippocampe, du phénomène de LTP, mécanisme physiologique candidat pour expliquer les processus d'apprentissage et de mémorisation.

1.1. Description générale de la LTP

Le terme de plasticité synaptique englobe l'ensemble des processus impliqués dans les changements d'efficacité de la transmission nerveuse, qui se mettent en place au niveau des connexions entre deux neurones, les synapses. La plupart des théories actuelles concernant les

bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire proposent que le stockage de l'information serait dû à des modifications de l'efficacité des synapses mises en jeu.

En 1973, dans une expérience princeps sur le lapin anesthésié, Bliss et Lomo montrent que de brèves stimulations à haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe déclenchent une augmentation durable (plusieurs heures) de l'efficacité des synapses impliquées. C'est le phénomène de LTP (Douglas et Goddard, 1975). En effet, des stimulations brèves à haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe vers le gyrus denté engendrent une augmentation de l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptiques (*excitatory post synaptic potentials*, EPSPs) qui persiste plusieurs heures. Ce type de stimulation provoque une dépolarisation post-synaptique suffisante pour d'une part atteindre plus rapidement le seuil de déclenchement du potentiel d'action et d'autre part permettre l'ouverture des récepteurs *N-methyl-D-aspartate* du glutamate (NMDA), ce qui induit une entrée massive de calcium dans la dendrite. Cette dernière entraîne alors l'activation de plusieurs cascades intracellulaires, conduisant *in fine* à des changements structuraux au niveau des synapses impliquées. Les différentes voies de signalisation mises en jeu ainsi que les changements structuraux qui en découlent seront abordés plus en détail à la page 17 du manuscrit.

Lors d'un apprentissage, le recrutement répété de certains circuits pourrait donc induire un renforcement synaptique durable suite à la mise en place d'un phénomène de LTP et permettre ainsi le stockage du souvenir.

1.2. LTP précoce et LTP tardive

Le phénomène de LTP peut être divisé en deux phases distinctes aussi bien à un niveau qualitatif (e.g., les stimulations les induisant), qu'à un niveau temporel ou encore moléculaire.

Une activation électrique rapide qui consiste en un seul train de stimulation à haute fréquence (100 Hz) entraîne une augmentation de l'efficacité synaptique durant 1 à 2 heures. Cette forme courte de LTP est appelée phase précoce de la LTP (*early-phase LTP*, e-LTP) ou encore phase d'induction de la LTP. Au niveau des mécanismes moléculaires sous-jacents, cette forme de LTP fait intervenir des modifications post-traductionnelles de certaines

protéines pour permettre leur transport au niveau des synapses (Malinow et Malenka, 2002), mais ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* (Bliss et Collingridge, 1993 ; Malenka et Bear, 2004).

Au contraire, une activation électrique répétée qui consiste en de multiples trains de stimulation à une fréquence similaire (100 Hz), induit une augmentation de l'efficacité synaptique qui peut persister de plusieurs heures (Frey et coll., 1988) à plusieurs jours (Abraham, 2003). On parle alors de phase tardive de la LTP (*late LTP*, I-LTP) ou encore de phase de maintenance (figure 5). Contrairement à la phase précoce, celle-ci conduit à l'expression de gènes et à une synthèse protéique *de novo* et est associée à des changements structuraux au niveau des synapses (Frey et coll., 1988 ; Harris et coll., 2003 ; Kandel, 2001 ; Muller et coll., 2002 ; Sutton et Schuman, 2006 ; Zhou et coll., 2006).

Ces différentes formes de LTP activent donc des voies de signalisation distinctes, ce qui conduit à des changements synaptiques spécifiques, aussi bien au niveau du type de changements induits que de leur durée (transitoires, e-LTP ou durables, I-LTP).

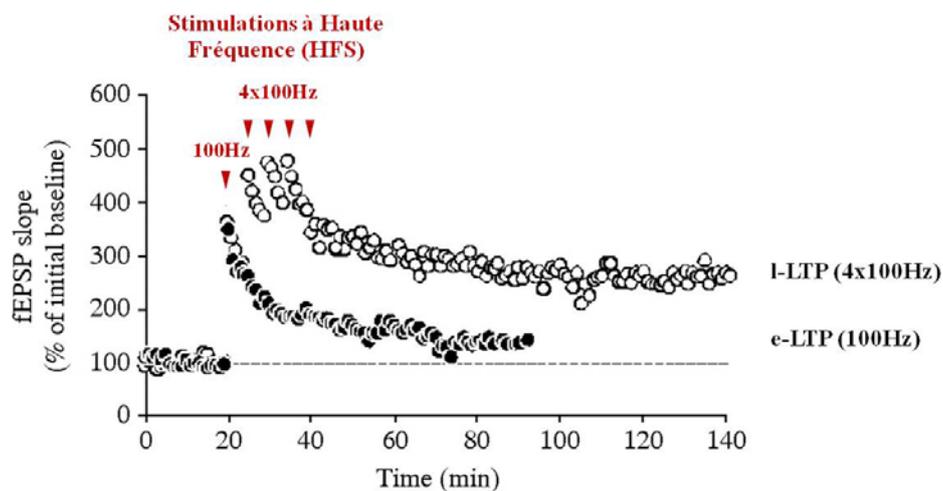


Figure 5 : Représentation des différentes phases de la LTP. La phase précoce (e-LTP : cercles foncés) est généralement induite par un train de stimulations à haute fréquence (HFS: triangle rouge) et dure 1 à 2 heures. La phase tardive ou de maintenance (I-LTP : cercles clairs) est induite par au moins 3 trains de HFS et est associée à une augmentation de l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptiques (EPSP) qui persiste dans le temps. Ces deux phases vont impliquer des mécanismes différents (adaptée de Woo et coll., 2003).

1.3. Mécanismes moléculaires sous-tendant les processus de LTP

L'induction de la LTP débute par la libération du neurotransmetteur L-glutamate par le neurone pré-synaptique. Cette libération entraîne l'activation des récepteurs post-synaptiques *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid* du glutamate (AMPA), ce qui induit une dépolarisation au niveau post-synaptique. Lorsque celle-ci est suffisante pour libérer les récepteurs NMDA du glutamate de leur bouchon Mg^{2+} , ceci provoque leur ouverture et permet ainsi une entrée rapide et massive de calcium dans le neurone post-synaptique. Le calcium intracellulaire active alors différents seconds messagers comme la calmoduline (CaM) et l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC), qui activent à leur tour plusieurs kinases. Il a été démontré que les protéines kinases telles que la protéine kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII) ou la protéine kinase C (PKC) sont nécessaires à l'induction de la e-LTP. Par ailleurs, une fois activées par les seconds messagers, ces kinases sont capables de s'activer de manière autonome et d'amplifier ainsi le phénomène (Sweatt et coll., 1998). L'activation des kinases induit alors différentes modifications au niveau synaptique, qui permettent le renforcement transitoire de la synapse mise en jeu. On note par exemple une phosphorylation de certaines sous-unités des récepteurs AMPA post-synaptiques, ce qui modifie leurs propriétés biophysiques. En effet, cette phosphorylation favorise leur ouverture et permet une amplification de la dépolarisation du neurone post-synaptique. L'expression de la e-LTP provoque également une augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau des dendrites du neurone post-synaptique, ce qui contribue également à renforcer la dépolarisation de l'élément post-synaptique (Massicotte et Baudry, 2004).

A partir d'un certain seuil de stimulation synaptique, on constate une augmentation persistante de l'AMPC, qui entraîne l'activation de la protéine kinase A (PKA). Celle-ci, en retour, stimule la voie des kinases MAP/Erk (*mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase*). Il a été montré que ces enzymes, tout comme la protéine kinase IV dépendante de la calmoduline (CaMKIV), sont impliquées dans la phase de maintenance de la LTP (pour revue : Pang et Lu, 2004). Ces enzymes sont capables de pénétrer dans le noyau et d'y activer des facteurs de transcription constitutifs comme CREB (*cAMP response element-binding protein*) et Elk-1 (Impey et coll., 1998 ; Roberson et coll., 1999 ; Davis et coll., 2000). Ces facteurs de transcription constitutifs peuvent alors initier la transcription de gènes précoces (*immediate early genes* (IEGs)). Parmi ces gènes, on trouve à la fois des facteurs de transcription inductibles comme Zif268 (ou EgR1) et c-Fos, qui activent à leur tour la

transcription de gènes effecteurs, et des IEGs plus tardifs comme le *bdnf* (*brain-derived neurotrophic factor*) ou *Arc* (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein* ou *Arg3.1*). Ces IEGs plus tardifs ne codent pas des facteurs de transcription, mais des protéines qui, par leur action sur les synapses, permettent de contribuer à la plasticité synaptique et à la formation de la mémoire (Lee et coll., 2004, Plath et coll., 2006) (figure 6). L'exemple du *bdnf* sera traité à la page 26 du manuscrit.

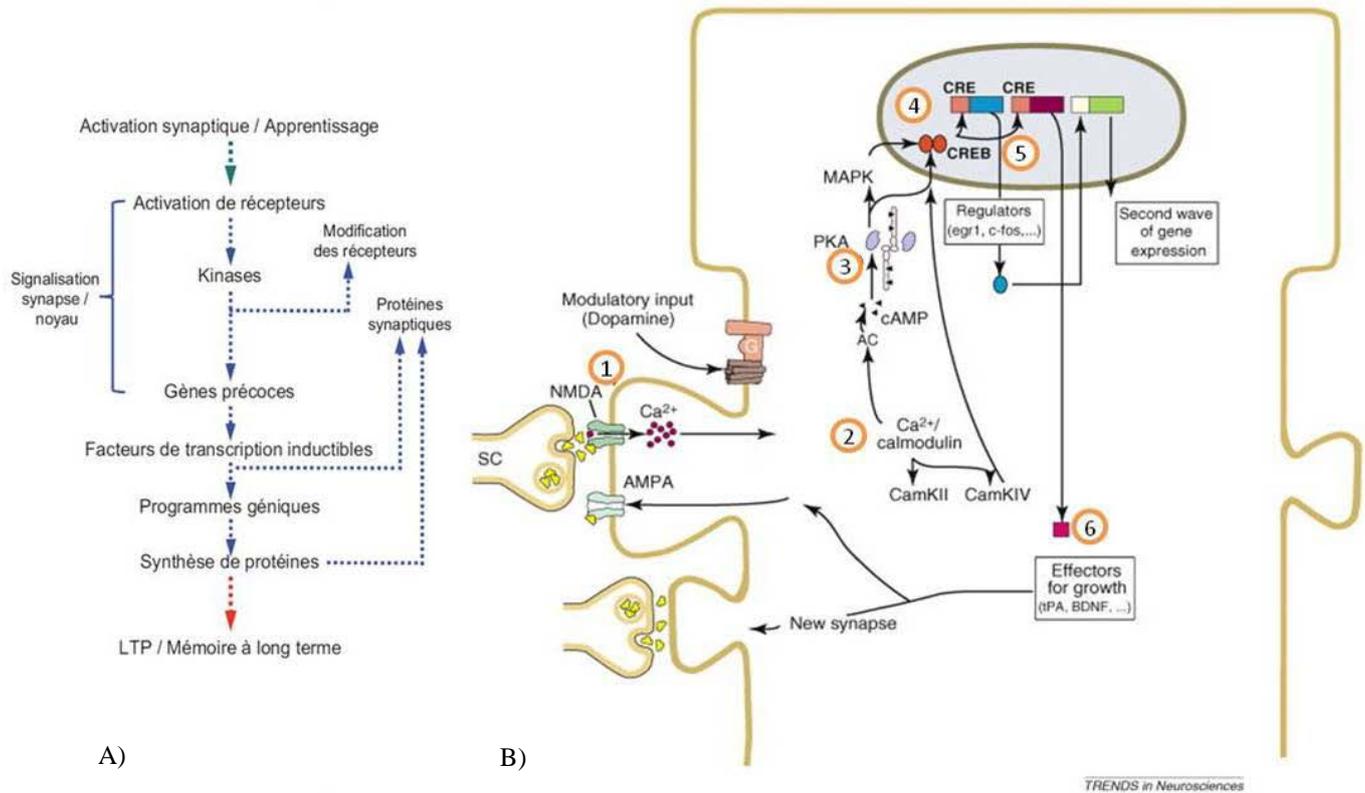


Figure 6 : Mécanismes moléculaires de la plasticité synaptique : exemple de la LTP. A) Représentation schématique des principales étapes des mécanismes moléculaires de la LTP. L'activation des récepteurs post-synaptiques et des voies de signalisation des protéines kinases entraînent des modifications de la sensibilité et du nombre de récepteurs, ainsi que la transcription de gènes précoces (IEGs) dans le noyau des neurones activés. Certains IEGs, comme Zif268 (ou Egr1) codent pour des facteurs de transcription inducibles qui activent la transcription de nombreux gènes cibles. Cette activation de la transcription ainsi que de la synthèse protéique sont nécessaires au maintien de la LTP et à la consolidation synaptique de la mémoire (adaptée de Laroche, 2010). B) Dans les neurones hippocampiques, la dépolarisation membranaire entraîne une augmentation du calcium intracellulaire via les récepteurs NMDA (1), qui permet l'activation de la calmoduline et des kinases associées comme la CaMKIV (2) ainsi que l'activation de la PKA et des MAPK via l'AMPC (3). Ces différentes kinases sont capables d'activer la phosphorylation de CREB (4), qui va alors induire la transcription de gènes précoces (IEGs) (5), qui à leur tour, peuvent activer la transcription de gènes effecteurs (5). Ces effecteurs vont être capables d'agir directement sur les synapses et favoriser ainsi la plasticité synaptique (adaptée de Benito et Barco, 2010).

Ces différentes voies de signalisation et plus particulièrement celles impliquées dans le maintien de la LTP sont également mises en jeu dans la formation d'un souvenir. En effet, plusieurs études montrent qu'en manipulant les différents acteurs de ces cascades intracellulaires, on observe des répercussions sur les capacités mnésiques. L'inhibition des MAPK, par exemple, entraîne des déficits de mémoire à long terme, aussi bien au niveau de la mémoire spatiale que pour le conditionnement de peur au contexte (CFC) (Atkins et coll., 1998 ; Blum et coll., 1999 ; Schafe et coll., 1999). Les MAPK sont donc impliquées dans le processus de consolidation des souvenirs (Adams et Sweatt, 2002 ; pour revue : Davis et Laroche, 2006). De même, l'inhibition des CaMK nucléaires dans les neurones du cerveau antérieur entraîne une perte de la phosphorylation de CREB normalement induite en réponse à l'activité neuronale, et donc une perte de son activation, associée à des troubles de la mémoire à long terme chez la Souris (Limback-Stokin et coll., 2004). Des déficits de mémoire à long terme sont également observés lorsque l'on agit à un niveau plus en aval de la cascade. En effet, plusieurs études ont montré que l'inhibition de la transcription et de la synthèse protéique perturbe d'une part la phase de maintenance de la LTP et d'autre part, les capacités de mémoire à long terme (pour revue : Hernandez et Abel, 2008). Il est intéressant de souligner que dans ces différentes études qui se sont focalisées plus particulièrement sur certains acteurs intracellulaires impliqués dans la phase de maintenance de la LTP, aucun déficit de mémoire à court terme n'a été observé. Ainsi, la mémoire à court terme pourrait plutôt être associée à la e-LTP, car ni l'une ni l'autre ne nécessitent de synthèse protéique *de novo*, alors que le passage d'un souvenir en mémoire à long terme serait associé à la mise en place de la l-LTP, tous deux impliquant une transcription de gènes et une synthèse protéique *de novo* (pour revues : Hernandez et Abel, 2008 ; Dudai, 2004 ; McGaugh, 2000 ; Martin et coll., 2000 ; Kandel et coll., 1986 ; Malenka et Nicoll, 1999).

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à cette transcription de gènes nécessaire au processus de consolidation des souvenirs (pour revue : Alberini, 2009) et nous focaliser plus précisément sur le rôle de certains facteurs de transcription dans les phénomènes de plasticité synaptique et de consolidation d'un souvenir.

2. Facteurs de transcription impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire

Un facteur de transcription est une protéine capable de se lier à la séquence promotrice d'un gène pour permettre la transcription de l'ADN en ARN. Ces facteurs peuvent agir seuls, mais également associés à d'autres protéines, formant ainsi des complexes transcriptionnels. Ces complexes sont capables de favoriser ou d'empêcher le recrutement des ARN polymérases sur les gènes, ce qui respectivement active ou réprime la transcription de ces gènes. Nous allons aborder dans cette partie la notion de facteur de transcription et nous intéresser plus particulièrement à deux facteurs de transcription impliqués dans les processus de plasticité synaptique : CREB et NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*). Il faut noter que d'autres mécanismes comme les modifications épigénétiques par exemple (méthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones) interviennent également dans la régulation de l'expression des gènes. Ceux-ci seront abordés dans le Chapitre 2 de l'introduction, page 37 du manuscrit.

2.1. CREB (*cAMP-responsive element binding protein*)

CREB appartient à la famille des facteurs de transcription dépendants de l'AMPc. Cette famille est composée de 3 membres chez les mammifères : CREB, CREM (*cAMP responsive element modulator*) et ATF-1 (*activating transcription factor 1*) (Gonzalez et coll., 1989 ; Foulkes et coll., 1991 ; Hai et coll., 1989).

CREB est exprimé dans l'ensemble des cellules de l'encéphale. Caractérisé par une localisation nucléaire, CREB va ainsi pouvoir contrôler la transcription de gènes dépendants de l'AMPc. Pour ce faire, CREB se fixe sous forme de dimère, sur des séquences spécifiques appelées éléments de réponse, situées sur les promoteurs de ses gènes cibles. Le site CRE (*cAMP-responsive element*), une séquence de 8 paires de bases (TGACGTCA), en est l'exemple le plus connu. L'activation de CREB nécessite sa phosphorylation préalable. Comme nous l'avons décrit précédemment (voir page 17), différentes voies de signalisation impliquant différentes kinases (PKA, CaMKIV, MAPK) permettent cette phosphorylation (pour revue : Mayr et Montminy, 2001 ; Benito et Barco, 2010). L'activation de CREB déclenche alors le recrutement de complexes protéiques, incluant la CREB-binding protein

(CBP), un co-activateur transcriptionnel. En effet, CREB possède un domaine *kinase-inductible domain* (KID) qui va permettre son interaction avec ces co-facteurs. Il faut préciser que, compte tenu de l'activité histone acétyltransférase (HAT) de CBP, ce recrutement induit par ailleurs l'acétylation des protéines histones au niveau des nucléosomes, ce qui favorise le relâchement de la chromatine. Cette conformation 'ouverte' de la chromatine est favorable à la fixation de l'ARN polymérase II, ce qui permet alors l'initiation de la transcription (figure 7) (Horn et Peterson, 2002).

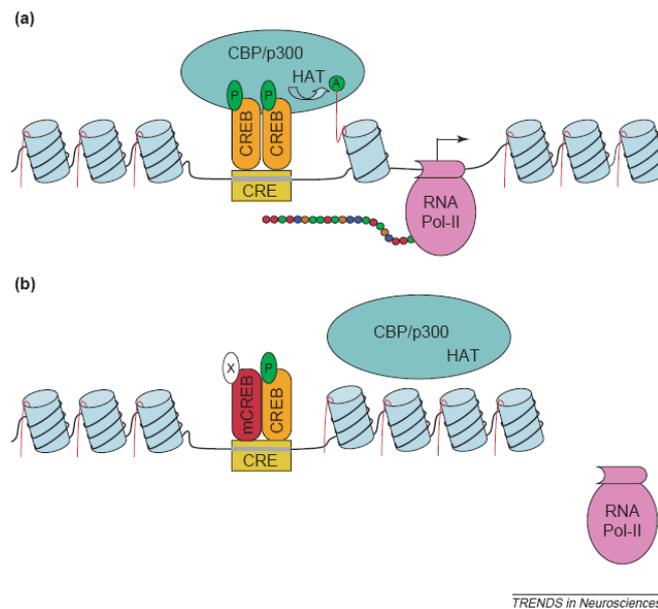


Figure 7 : Représentation schématique simplifiée du mode d'action de CREB dans la transcription des gènes. (a) La phosphorylation des 2 membres du dimère CREB au niveau de la sérine 133 (Ser133) permet le recrutement des protéines associées, incluant CBP et p300, ce qui favorise l'assemblage d'un complexe transcriptionnel. Ce complexe entraîne un changement de conformation de la chromatine, en partie *via* l'activité acétyltransférase de CBP ou p300. Cette conformation 'ouverte' de la chromatine permet l'accès de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs de gènes. (b) Une mutation de CREB (mCREB), qui abolit la phosphorylation de celui-ci au niveau de la Ser133, empêche le recrutement de CBP/p300 et réprime la transcription des gènes (adaptée de Carlezon et coll., 2005).

L'implication de CREB dans les phénomènes de plasticité synaptique et de mémoire est largement reconnue dans la littérature (pour revues : Benito et Barco, 2010 ; Barco et Marie, 2011).

La forme active de CREB permet la maintenance de la LTP (Bartsch et coll., 1998 ; Barco et coll., 2002 ; pour revue : Barco et coll., 2006) et est associée à une régulation de l'expression des gènes dans l'hippocampe (Bito et coll., 1996 ; Impey, 1996). En effet, de nombreuses études menées sur différents modèles transgéniques soulignent l'importance de l'activité de CREB ainsi que des autres membres de cette famille de facteurs de transcription, comme CREM, pour la maintenance de la LTP (pour revue : Barco et Marie, 2011). Par exemple, une stimulation de type e-LTP (un train de stimulations) est suffisante pour induire la l-LTP chez des souris qui surexpriment la forme active de CREB dans CA1. En effet, cette surexpression permet notamment de diminuer le seuil de l-LTP (Barco et coll., 2002).

CREB est par ailleurs impliqué dans la formation de différents types de mémoire à long terme comme la mémoire de peur (CFC et conditionnement de peur au son), de reconnaissance, olfactive ou encore certaines formes de mémoire spatiale (pour revues : Silva et coll., 1998 ; Alberini, 2009 ; Benito et Barco, 2010 ; Sakamoto et coll., 2011). Après un apprentissage en MWM par exemple, il a été montré que CREB est phosphorylé et entraîne l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques (Porte et coll., 2008). Cette implication de CREB dans les processus mnésiques est également renforcée par des études portant sur différents modèles transgéniques, qui soulignent son importance dans la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe (Pittenger et coll., 2002 ; Kida et coll., 2002 ; Kim et coll., 2011 ; Suzuki et coll., 2011). L'ensemble de ces données démontre donc l'importance de CREB dans les processus de plasticité synaptique associés à la consolidation d'un souvenir.

Bien que la majorité des études concernant la plasticité synaptique se soient focalisées sur le facteur de transcription CREB, il a plus récemment été démontré que d'autres facteurs de transcription, comme NF- κ B, peuvent également jouer un rôle dans ces processus (pour revue : Meffert et Baltimore, 2005).

2.2. NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*)

Les membres de la famille des facteurs de transcription NF- κ B/Rel sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Cette famille de facteurs de transcription

est composée de 5 membres : p50, p52, p65 (ou RelA), c-Rel et RelB. Ces facteurs fonctionnent en dimères et par conséquent, ces 5 sous-unités peuvent se retrouver sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Chaque membre de la famille NF- κ B/Rel possède un domaine d'homologie *Rel*. Ce domaine contient les séquences permettant la localisation nucléaire de ces facteurs de transcription, mais également leur fixation à l'ADN, leur dimérisation, ainsi que leurs interactions avec le complexe protéique inhibiteur I κ B. En effet, ces dimères existent dans le cytoplasme sous forme latente, associés au complexe I κ B. L'activation de la voie NF- κ B recrute un autre complexe composé de protéines kinases, qui phosphoryle le complexe inhibiteur I κ B. Ceci engendre alors l'ubiquitination et la dégradation du complexe I κ B par le protéasome, ce qui libère les dimères, entraînant ainsi leur translocation dans le noyau et l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (figure 8).

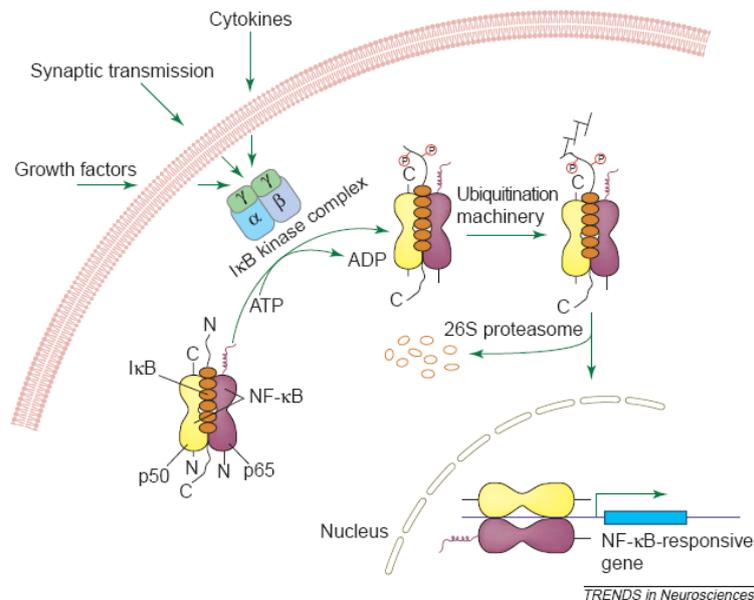


Figure 8 : Voie de l'activation de NF- κ B. L'activation des sous-unités dimériques de NF- κ B (p50 et p65) est régulée par leur association avec le complexe protéique inhibiteur I κ B. En effet, lorsqu'ils sont associés au complexe I κ B, les domaines de fixation à l'ADN ainsi que les domaines permettant la localisation nucléaire des dimères sont masqués. Le complexe NF- κ B/I κ B reste alors dans le cytoplasme. Suite à un stimulus (cytokines, transmission synaptique, facteurs de croissance), on observe une activation du complexe enzymatique 'I κ B kinases', qui phosphoryle le complexe inhibiteur I κ B et induit de ce fait sa dégradation par le protéasome 26S. Cette dégradation permet alors la libération de NF- κ B, sa translocation dans le noyau et donc l'activation de la transcription des gènes (adaptée de Meffert et Baltimore, 2005).

NF- κ B est initialement connu pour son rôle crucial dans le système immunitaire à travers son implication dans la transcription de gènes en réponse au processus d'inflammation (Li et coll., 2002). Pourtant, cette famille de facteurs de transcription est exprimée dans le système nerveux central et périphérique, aussi bien dans les neurones que dans les cellules non-neuronales, comme les cellules gliales.

Un certain nombre d'études montre l'implication de NF- κ B dans la régulation des processus de plasticité synaptique et de mémoire (pour revue : Meffert et Baltimore, 2005). Différentes études *in vitro* ont tout d'abord montré que NF- κ B est activé suite à une dépolarisation neuronale (Kaltschmidt et coll., 1995 ; Guerrini et coll., 1995 ; Meffert et coll., 2003). D'autres travaux se sont ensuite focalisés sur certains acteurs intracellulaires impliqués dans diverses voies de signalisation. On observe par exemple que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs NMDA du glutamate entraîne une diminution de l'activité basale de NF- κ B (Lilienbaum et Israel, 2003). Par ailleurs, une élévation des taux de Ca²⁺ intracellulaires induit une activation de la CaMKII et est associée, *in fine*, à l'activation de NF- κ B (Meffert et coll., 2003). Or, ces différents acteurs sont impliqués dans la voie de signalisation de la LTP. Ainsi, cette cascade intracellulaire pourrait aboutir à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ceci est confirmé par des études *in vivo* qui montrent qu'une stimulation à haute fréquence induisant la L-LTP au niveau de la voie perforante induit une augmentation de l'expression des sous-unités p50 et p65 d'une part (Meberg et coll., 1996), et l'activation du complexe NF- κ B d'autre part (Freudenthal et coll., 2004). Les études de Kaltschmidt et collaborateurs renforcent également l'idée d'un lien entre NF- κ B et LTP. Ils ont en effet observé des déficits de LTP chez des souris surexprimant un inhibiteur de NF- κ B (appelé *I κ B α superrepressor*, *I κ B α -SR*) dans les neurones du cerveau antérieur. Il est intéressant de noter que les auteurs ont par ailleurs mis en évidence que la sous-unité catalytique α de la PKA est une cible de NF- κ B (Kaltschmidt et coll., 2006). L'activation de NF- κ B par la voie de signalisation de la LTP pourrait donc en retour favoriser l'activation de la voie PKA/CREB, essentielle aux processus d'apprentissage et de mémorisation (Kandel, 2001).

Plusieurs études portant sur les modèles transgéniques ont d'ailleurs souligné l'implication de NF- κ B dans les processus d'apprentissage et de mémoire chez le rongeur (pour revue : Kaltschmidt et Kaltschmidt, 2009). Meffert et collaborateurs ont par exemple montré que des souris knock-out pour p65 (p65^{-/-}) présentent des déficits d'apprentissage

spatial (Meffert et coll., 2003). De même, les souris surexprimant l'inhibiteur de NF- κ B (appelé *IkB α superrepressor (IkBa-SR)*) dans les neurones du cerveau antérieur présentent, en plus des déficits de LTP cités précédemment, des troubles de l'apprentissage spatial (Kaltschmidt et coll., 2006).

L'ensemble de ces données montre donc que NF- κ B est activé par la voie de signalisation de la LTP et qu'il participe ainsi aux processus de plasticité synaptique et de mémoire. Il est intéressant de noter que parmi les gènes cibles de NF- κ B impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique, on trouve des facteurs neurotrophiques, des récepteurs glutamatergiques et des protéines régulées par le calcium. NF- κ B, tout comme CREB, est par exemple impliqué, en réponse à l'activité neuronale, dans l'augmentation de l'expression du *bdnf* (*brain-derived neurotrophic factor*), une neurotrophine jouant un rôle particulièrement important dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Marini et coll., 2004).

3. Présentation d'un gène de la mémoire :

Le brain-derived neurotrophic factor (bdnf)

3.1. BDNF, une neurotrophine particulière

Le BDNF est une petite protéine sécrétée, dimérique, appartenant à la famille des neurotrophines. Cette famille est composée de 4 membres : le BDNF, le *nerve growth factor* (NGF), la *neurotrophine-3* (NT3) et la *neurotrophine 4/5* (NT4/5). La protéine BDNF (14kDa) est obtenue par clivage de sa protéine précurseur, le pro-BDNF (32kDa). Ce clivage est réalisé dans le milieu extracellulaire par la plasmine, elle-même activée par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Le BDNF s'exprime de façon ubiquitaire dans l'organisme. En ce qui concerne son expression au niveau cérébral, on le retrouve aussi bien dans des populations neuronales en développement que dans des neurones matures. Lors du développement, le BDNF mature est impliqué dans la régulation des processus de survie et de différenciation des populations neuronales, aussi bien au niveau du système nerveux périphérique que du système nerveux central (McAllister et coll., 1999). Dans le cerveau adulte, il a plus récemment été impliqué dans les processus de transmission synaptique et de plasticité cérébrale, en particulier au niveau de synapses de type glutamatergique (Bramham et Messaoudi, 2005 ; Poo, 2001 ; Schinder et coll., 2000).

Les réponses physiologiques induites par les neurotrophines en général, et le BDNF en particulier, sont générées par l'activation de deux classes distinctes de récepteurs transmembranaires : un récepteur à haute affinité, le TrkA, B ou C (*tropomyosin-related kinase A/B/C*), à activité tyrosine kinase spécifique en fonction du type de neurotrophine (TrkA pour le NGF, TrkB pour le BDNF et TrkC pour NT3 and NT4/5), et un récepteur p75NTR de basse affinité. Ce récepteur, contrairement au récepteur TrkB, est activable par la forme mature du BDNF mais également par le pro-BDNF, et est susceptible d'induire la mort cellulaire *via* ce dernier (Lee et coll., 2001 ; Teng et coll., 2005). Le BDNF mature et son récepteur TrkB sont co-localisés au niveau des synapses de type glutamatergique, aussi bien au niveau pré-synaptique que post-synaptique (dendrites). C'est dans la structure hippocampique que cette co-localisation est la plus remarquable (Bramham et Messaoudi, 2005). La fixation du BDNF sur le récepteur TrkB résulte en une dimérisation de celui-ci, entraînant une trans-autophosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires. Ceci permet alors l'activation de différentes voies de signalisation comme les cascades de signalisation des MAPK, de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ou encore de la phospholipase C γ (PLC γ). Ces voies aboutissent à l'activation de facteurs de transcription, comme CREB, permettant ainsi la régulation de processus clés comme la survie cellulaire ou la plasticité synaptique (figure 9) (pour revue : Cunha et coll., 2010).

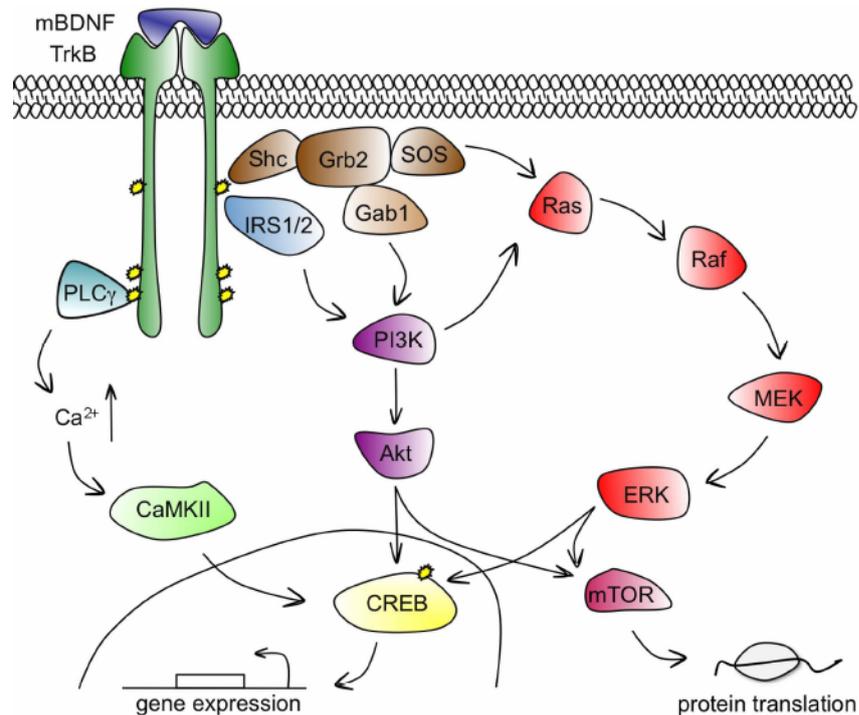


Figure 9 : Voies de signalisation BDNF/TrkB. En se fixant sur le récepteur TrkB, le BDNF induit sa dimérisation et une autophosphorylation au niveau des résidus tyrosines du domaine cytoplasmique des récepteurs. Ceci active 3 voies de signalisation majeures (PLC γ , PI3K et la cascade des MAPK/ERK), qui mènent à l'activation de CREB, permettant ainsi la transcription des gènes (adaptée de Cunha et coll., 2010).

3.2. BDNF et LTP

Parmi les neurotrophines, le BDNF est la mieux caractérisée quant à son implication dans les phénomènes de LTP. En effet, la LTP est associée à l'activation de cascades de signalisation, incluant celles induites par le BDNF. Plusieurs études mettent en évidence le rôle critique du BDNF dans la LTP au niveau hippocampique, aussi bien en ce qui concerne la phase précoce (e-LTP) que la phase tardive (l-LTP) de la LTP (Figurov et coll., 1996 ; Korte et coll., 1996 ; Patterson et coll., 1996 ; Kang et coll., 1997 ; Pang et Lu, 2004). On note par exemple des altérations de la l-LTP chez des souris BDNF^{-/-} et des souris BDNF^{+/-}, altérations qui peuvent être restaurées par une perfusion de BDNF exogène (Korte et coll., 1996 ; Pang et Lu, 2004). Le BDNF semble réguler les deux phases de la LTP (précoce et tardive) par des mécanismes différents. En effet, lors de la e-LTP, le stock de BDNF présent au niveau pré-synaptique est libéré. Il interagit alors avec les récepteurs TrkB, ce qui permet *in fine* la modification de protéines préexistantes au niveau pré- et post-synaptique

(Minichiello et coll., 1999 ; Pozzo-Miller et coll., 1999 ; Jovanovic et coll., 2000 ; Xu et coll., 2000 ; Zakharenko et coll., 2003 ; Gartner et coll., 2006). Par exemple l'activation de la voie BDNF/TrkB entraîne la phosphorylation d'une protéine vésiculaire, la synapsine, ce qui permet de faciliter la libération de neurotransmetteurs (Jovanovic et coll., 2000). Au contraire, la L-LTP nécessite la synthèse et la libération du pro-BDNF, puis sa conversion extracellulaire en BDNF mature (Pang et Lu, 2004). Le BDNF mature facilite l'activité des synapses glutamatergiques *via* la synthèse protéique *de novo*, nécessaire à la maintenance de la LTP (Yin et coll., 2002 ; Schratt et coll., 2004). En effet, la voie BDNF/TrkB active les cascades de signalisation PLC γ , PI3K et MAPK/ERK, qui convergent vers le noyau et phosphorylent CREB. Ceci permet alors l'activation transcriptionnelle de différents gènes fortement impliqués dans les processus de plasticité synaptique comme *zif268*, *Arc* et *Homer* (Ying et coll., 2002 ; Sato et coll., 2001 ; Rosenblum et coll., 2002 ; Alder et coll., 2003). Enfin, l'activation du récepteur TrkB par le BDNF est également capable d'induire la propre expression du *bdnf* (Koponen et coll., 2004 ; Saarelainen et coll., 2001). Il existe ainsi un mécanisme de rétrocontrôle positif, qui permet le maintien de la L-LTP *via* une synthèse du BDNF induite par le BDNF lui-même.

3.3. Implication du BDNF dans l'apprentissage et la mémoire

Le rôle du BDNF dans la LTP est fortement corrélé à sa contribution aux mécanismes d'apprentissage et de mémoire.

Plusieurs études soulignent en effet l'implication du BDNF dans les processus d'apprentissage. On note par exemple un retard d'apprentissage en MWM (Linnarsson et coll., 1997) et des déficits d'apprentissage dans une tâche de CFC (Liu et coll., 2004) chez des souris transgéniques BDNF $^{+/-}$. Des résultats similaires sont également observés dans un modèle knock-out conditionnel induisant une réduction de 70% des ARNm du *bdnf* et de la protéine BDNF dans l'hippocampe de souris adultes, puisque ces souris présentent des déficits de CFC. Ces déficits sont d'ailleurs corrélés à une altération de la LTP, ce qui illustre à nouveau le rôle du BDNF dans les processus de plasticité synaptique, sous-tendant les phénomènes de mémorisation (Monteggia et coll., 2004). De même, l'utilisation d'antisens ou encore d'anticorps dirigés contre le BDNF, et ce juste avant l'apprentissage, empêche l'acquisition dans des tâches spatiales et d'évitement (Alonso et coll., 2002 ; Ma et coll.,

1998). Le même type de déficits d'apprentissage est observé lorsque l'on agit au niveau des récepteurs du BDNF. En effet, la délétion des récepteurs TrkB au niveau du cerveau antérieur est associée à des troubles de l'apprentissage spatial (Minichiello et coll., 1999), alors qu'au contraire, la surexpression de ces récepteurs permet d'améliorer les capacités d'apprentissage spatial (Koponen et coll., 2004). Ces diverses études montrent donc que le BDNF est nécessaire au processus d'apprentissage.

On note par ailleurs un pic d'expression du *bdnf* suite à un apprentissage. On constate en effet une augmentation des taux d'ARNm du *bdnf* dans l'hippocampe en réponse à un apprentissage, et ce dans différents tests comme le MWM, le CFC ou encore le test d'évitement passif (pour revues : Yamada et Nabeshima, 2003 ; Lu et coll., 2008). Or, l'inhibition de ce pic de transcription empêche le rappel des informations spatiales correctement encodées au préalable (Mizuno et coll., 2000). De même, l'administration d'un anticorps anti-BDNF juste après un apprentissage (1h ou 4h) dans une tâche d'évitement perturbe la mémoire à long terme. *A contrario*, une administration intra-hippocampique de BDNF, effectuée à ces mêmes délais post-acquisition, améliore les capacités de mémoire à long terme testée à 24h (Alonso et coll., 2002 ; Ma et coll., 1998). Ce pic d'expression du *bdnf* post-acquisition est donc impliqué dans la consolidation des souvenirs, et favorise ainsi le rappel correct des informations à 24h.

Il est intéressant de noter qu'un deuxième pic d'expression du *bdnf* plus tardif (12h) est observé suite à un apprentissage et que l'utilisation d'anticorps dirigés contre le BDNF 12h après le CFC induit des déficits de rétention de l'information à 7 jours (Bekinschtein et coll., 2007). Par contre, une administration intra-hippocampique de BDNF à ce même délai (12h après le CFC) est capable de contrer les déficits de rétention induits normalement par l'inhibition de la synthèse protéique (Bekinschtein et coll., 2008(a)). Ces résultats suggèrent que ce pic plus tardif d'expression du *bdnf* en réponse à un apprentissage est impliqué dans la consolidation et le maintien à plus long terme des souvenirs.

L'ensemble de ces études soulignent donc le rôle crucial du *bdnf* dans les processus d'apprentissage, mais également son implication dans la consolidation et le maintien à long terme des souvenirs.

Il est intéressant d'ajouter que chez l'Homme, le polymorphisme val66met (substitution d'une valine par une méthionine au codon 66) du BDNF affecte la libération du BDNF induite par l'activité neuronale et est associée à des déficits au niveau de la mémoire épisodique (Egan et coll., 2003).

3.4. Régulation du gène codant le BDNF

La protéine BDNF est synthétisée à partir d'un gène dont la structure est particulièrement complexe. En effet, une caractérisation récente a mis en évidence 8 exons non-codants situés en 5' (notés exon I à VIII) et un exon codant la protéine situé en 3' (noté IX). Après épissage alternatif, au moins 11 transcrits différents peuvent être générés à partir du gène du *bdnf*, tous codant pour le pro-BDNF, qui sera ensuite clivé en BDNF mature (Aid et coll., 2007) (figure 10).

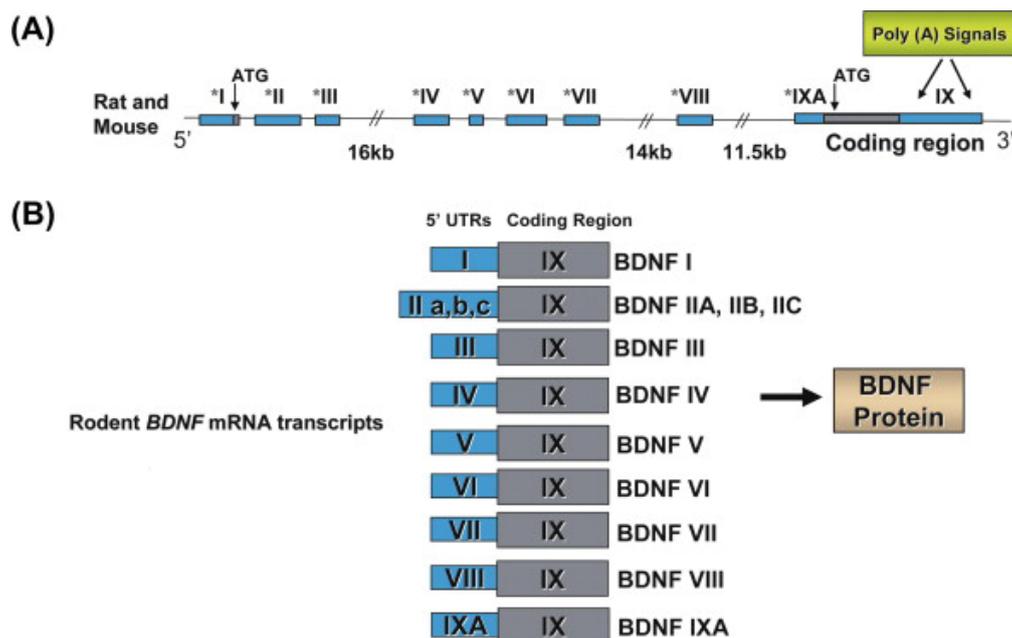


Figure 10 : (adaptée de Lubin, 2011) : Structure du gène du *bdnf* chez le rongeur. (A) Le gène du *bdnf* contient au moins 8 exons 5' non-codants, chacun possédant son propre promoteur, et un exon 3' codant le BDNF. (B) Chaque transcrit contient une des régions 5' non-traduite (5'UTRs) épissée au niveau de l'exon codant (IX). La transcription peut également être initiée dans l'intron précédent l'exon codant, ce qui résulte en un transcrit IXA composé d'une extension en 5'. Pour l'exon II, on observe 3 transcrits possible : IIA, IIB et IIC. (Nomenclature adaptée de Aid et coll., 2007).

Chaque exon non-codant contenant son propre promoteur, l'expression des différents transcrits du pro-BDNF est contrôlée de manière spatio-temporelle en réponse à divers stimuli. Les différents transcrits présentent donc chacun des profils d'expression spécifiques. On peut citer l'ARNm de l'exon-I, qui est exprimé dans différentes structures de l'encéphale (avec un niveau d'expression variable en fonction de la structure), alors qu'on n'en détecte de très faibles taux dans les tissus non-cérébraux, contrairement aux exons IV et VI que l'on retrouve aussi bien dans l'encéphale que dans le cœur ou les poumons par exemple. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'activité neuronale régule le transport des transcrits, qui se retrouvent au sein de compartiments cellulaires différents, incluant les dendrites. Ceci permet alors une traduction locale au niveau des synapses 'actives' (pour revue : Tongiorgi, 2008). En plus d'une spécificité spatiale, ces promoteurs répondent différenciellement à l'activité neuronale (Marmigère et coll., 2001 ; Aid et coll., 2007 ; Tian et coll., 2009). Par exemple, une stimulation par le kaïnate, un analogue glutamatergique qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, active la transcription des exons I, IV, V, VIII et IXA mais n'a aucun effet sur celle des exons III et VI. De plus, les transcrits induits par le traitement au kaïnate présentent chacun des cinétiques d'activation particulières (Aid et coll., 2007).

Compte tenu des multiples fonctions du BDNF dans le cerveau adulte et de son importance dans les processus d'apprentissage et de mémoire, il semble primordial de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des différents transcrits du pro-BDNF en réponse à l'activité neuronale.

Pour résumer, un apprentissage hippocampo-dépendant induit des mécanismes de plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. Le processus de consolidation des souvenirs nécessite en effet l'activation de voies de signalisation intracellulaires, qui aboutissent à la transcription de gènes 'pro-mnésiques', comme le *bdnf* par exemple. Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, la transcription de ces gènes est régulée par l'activation de facteurs de transcription spécifiques.

Il existe cependant un deuxième niveau de régulation de la transcription, *via* la mise en place de modifications épigénétiques. Ces modifications épigénétiques entraînent un remodelage de la structure de la chromatine au niveau des promoteurs de gènes, ce qui permet

d'activer ou de réprimer, selon les modifications épigénétiques mises en jeu, la transcription de ces gènes. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre d'études récentes a mis en évidence l'implication de ces mécanismes dans les processus mnésiques.

Dans le prochain chapitre, nous allons introduire les modifications épigénétiques et nous intéresser plus particulièrement à leur implication dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire. Nous nous focaliserons notamment sur le rôle de ces modifications dans la régulation de l'expression du *bdnf*.

CHAPITRE 2

MECANISMES EPIGENETIQUES

ET

MEMOIRE

CHAPITRE 2

MECANISMES EPIGENETIQUES ET MEMOIRE

I- Modifications épigénétiques et régulation de la transcription

1. Introduction générale

Comme nous avons pu le voir au cours du chapitre précédent, la plasticité synaptique et la consolidation de la mémoire nécessitent toutes deux la transcription de certains gènes et la synthèse protéique *de novo*. Cette transcription de gènes est régulée par des facteurs de transcription. Il existe cependant un deuxième niveau de régulation de l'expression des gènes : les modifications épigénétiques. En effet, celles-ci permettent un remodelage de la structure de la chromatine, ce qui active ou réprime, selon les modifications épigénétiques mises en jeu, la transcription des gènes.

D'après nos connaissances actuelles dans le domaine des Neurosciences, il semble évident que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle important aussi bien lors du développement du système nerveux central (SNC), qu'à l'âge adulte, lors des phénomènes de plasticité synaptique ou lors des processus d'apprentissage et de mémorisation par exemple. Pourtant, les premières théories de Francis Crick (1916-2004) qui proposa, en 1984, que la mémoire pourrait être codée par des changements au niveau de certaines régions de l'ADN chromosomique (Crick, 1984) n'ont pas eu d'impact majeur dans la communauté scientifique. Il a fallu attendre encore une vingtaine d'années (2004), pour que les modifications épigénétiques, et plus particulièrement l'acétylation des histones, soient clairement reconnues comme impliquées dans les mécanismes de formation de la mémoire (Levenson et coll.,

2004). Depuis, le nombre d'études concernant les modifications épigénétiques dans le SNC n'a cessé d'augmenter, notamment suite à la prise de conscience de leur implication aussi bien au sein de nombreux processus physiologiques comme la différenciation cellulaire par exemple, que dans plusieurs pathologies du SNC telles que le syndrome de Rubinstein-Taybi et la maladie d'Alzheimer (pour revue : Graff et coll., 2011).

1.1. Définitions et terminologie

Le terme « épigénétique » est introduit pour la première fois en 1942, par le généticien Conrad Waddington. Ce terme se décompose en 'épi' « *au-dessus* » et 'génétique' « *les caractères héréditaires* » et caractérise l'ensemble des mécanismes qui permettent à un seul génotype de générer différents phénotypes, aussi bien à l'échelle cellulaire qu'à l'échelle de l'individu. Ainsi, Waddington imaginait le développement et l'hérédité comme la conséquence d'un dialogue entre l'information génétique et l'environnement. Par ce biais, il a donc souligné les limites de la génétique à expliquer, à elle seule, le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Grâce à la découverte de la double-hélice de l'ADN par Watson et Crick en 1953, l'épigénétique n'est de ce fait plus considérée comme s'opposant à la génétique, mais plutôt comme la complétant, tout en admettant la prééminence des mutations aléatoires du génome et la sélection naturelle.

Différents travaux ont depuis montré que les modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, pouvaient influencer l'expression des gènes à la fois dans le temps et dans l'espace (Holliday et Pugh, 1975 ; Riggs, 1975). On peut donc définir l'épigénétique comme l'ensemble des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes en affectant la structure de la chromatine, sans modification de la séquence génomique (Wolffe et Matzke, 1999). Ces modifications sont réversibles et illustrent l'influence de l'environnement sur l'expression des gènes. Elles sont essentielles pour les fonctions cellulaires et le développement de l'organisme. En effet, des altérations de ces mécanismes sont à l'origine de diverses pathologies humaines, comme certaines formes de cancer par exemple (Wolffe et Matzke, 1999).

1.2. Structure de l'ADN

Dans le noyau des cellules eucaryotes, le matériel génétique s'organise en une structure complexe composée d'ADN et de protéines. Cette structure est appelée chromatine par Flemming W. en 1878. On trouve environ deux mètres d'ADN dans chaque cellule, et ce dans un noyau de quelques micromètres de diamètre seulement. Cet incroyable degré de compaction de l'ADN est obtenu suite à une succession de différents niveaux de compaction.

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, permet d'obtenir le premier niveau de compaction. Il s'agit d'un double brin d'ADN d'environ 146 paires de base (pb), qui s'enroule autour d'un octamère d'histones. Chaque octamère est constitué de deux copies de chaque histone (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4) (figure 11). Une cinquième protéine histone, l'histone H1, permet de stabiliser le nucléosome.

Les histones sont de petites protéines (11 à 22 kDa), qui sont très bien conservées au cours de l'évolution. Il s'agit de protéines basiques chargées positivement, constituées d'un noyau globulaire et d'une extrémité N-terminale. La présence de ces charges positives permet aux histones d'interagir avec le squelette phosphodiester de l'ADN chargé négativement, et ce indépendamment de la séquence nucléotidique.

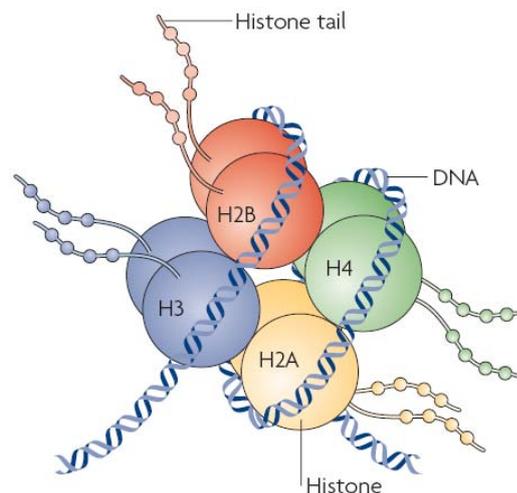


Figure 11 : Organisation du nucléosome. L'ADN est enroulé autour d'un octamère d'histones composé de 2 copies de chaque histone, H2B, H2A, H3 et H4. Les extrémités N-terminales des histones sortent du complexe et peuvent ainsi être sujettes à des modifications post-traductionnelles (adaptée de Tsankova et coll., 2007).

La formation de nucléosomes permet de compacter l'ADN de 5 à 10 fois et d'obtenir ainsi une fibre de 11 nm de diamètre appelée « collier de perles ». Les nucléosomes sont ensuite compactés en une structure hélicoïdale de 30 nm de diamètre. La compaction se poursuit par la formation de boucles à partir de la fibre de 30 nm pour obtenir une fibre de 300 nm de diamètre, puis une structure de 700 nm de diamètre correspondant au degré ultime de compaction, le chromosome (figure 12).

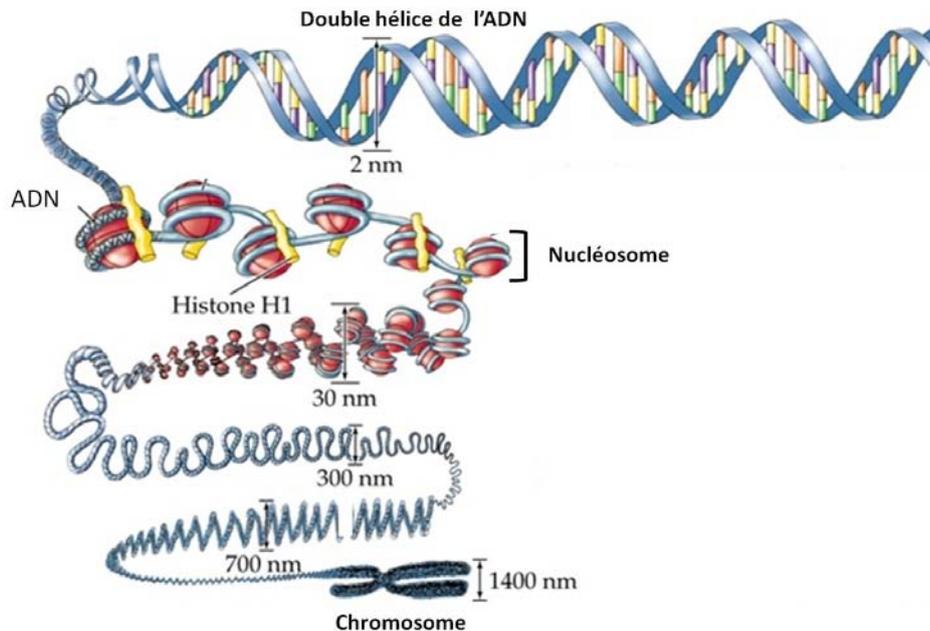


Figure 12 : Représentation des différents niveaux de compaction de l'ADN. La double hélice de l'ADN s'enroule autour d'histones afin de former les nucléosomes. Différents niveaux de compaction se succèdent ensuite jusqu'à obtenir le stade final de compaction, le chromosome.

Le degré de compaction de la chromatine régule l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et définit ainsi le degré d'expression des gènes. Lorsque la chromatine est fortement condensée, l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN est limité, ce qui tend à réprimer la transcription. Cet état inactif de la chromatine est appelé hétérochromatine. Au contraire, un état relâché de la chromatine favorise l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, ce qui permet d'induire la transcription des gènes. On parle alors de conformation active de la chromatine ou euchromatine. Il existe en réalité différents stades de compaction intermédiaires entre ces deux états extrêmes et les

modifications épigénétiques permettent de basculer d'un état de compaction à l'autre. De petites portions de chromatine sont ainsi remodelées, ce qui modifie leur degré de compaction et permet donc de réguler finement l'expression des gènes à la fois de manière spatiale et temporelle (pour revue : Tsankova et coll., 2007) (figure 13).

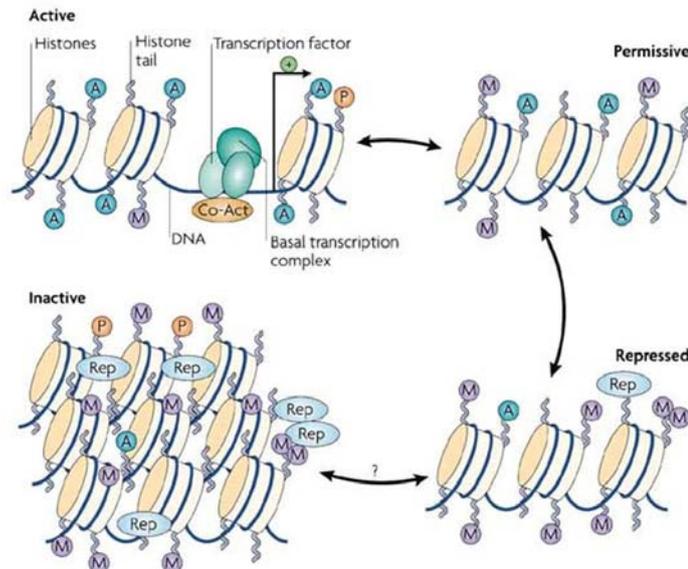


Figure 13 : Représentation simplifiée des différentes conformations de la structure de la chromatine. Il existe différents stades de compaction de la chromatine allant de l'état fortement condensé et inactif, dans lequel la transcription est réprimée (hétérochromatine), à l'état relâché et actif, dans lequel la transcription est activée (euchromatine). Les modifications épigénétiques permettent de faire basculer certaines portions de la chromatine d'un état de compaction à un autre. L'acétylation des histones (A) par exemple entraîne le relâchement de la chromatine, ce qui favorise l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN et active donc la transcription des gènes présents sur cette portion d'ADN (adaptée de Tsankova et coll., 2007).

2. Méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones

Il existe plusieurs types de modifications épigénétiques. Celles-ci peuvent être dirigées directement sur le brin d'ADN, comme c'est le cas lors de la méthylation de l'ADN, ou impliquer des modifications post-traductionnelles des histones.

2.1. Méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle

La méthylation de l'ADN est observée chez la plupart des organismes vivants, de la bactérie aux mammifères (Bird, 2002). Chez les eucaryotes, elle consiste en l'ajout, de manière covalente, d'un groupement méthyle (-CH₃) en position 5 d'une base cytosine de l'ADN. Cette réaction s'effectue grâce au donneur de méthyle, la S-adénosylméthionine (SAM). Chez les vertébrés, cette réaction se déroule exclusivement au niveau de dinucléotides CpG, c'est-à-dire au niveau d'une cytosine précédant une base guanidine. Ces CpG sont répartis de manière non uniforme, avec une sous-représentation générale (1% du génome), et on observe une localisation préférentielle au niveau de courtes régions, appelées îlots CpG. Ces derniers sont classiquement définis par une longueur d'au moins 200 paires de bases contenant au moins 50% de GC. Sur les 45000 îlots CpG que contient le génome, la plupart de ceux situés à proximité ou dans le promoteur des gènes sont hypométhylés dans les cellules normales, à l'exception de ceux se trouvant chez la femelle sur le chromosome X inactif.

La méthylation de l'ADN est catalysée par les enzymes de la famille des *DNA methyltransferases* (DNMTs). La grande majorité des réactions de méthylation de l'ADN fait intervenir les DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. La DNMT1 a été la première à être identifiée. Du fait de sa préférence pour l'ADN hémiméthylé, elle est considérée comme une méthyltransférase de '*maintenance*'. Elle est en grande partie responsable du maintien des profils de méthylation préexistants en assurant la transmission des profils de méthylation de la cellule mère aux cellules filles lors de la réplication de l'ADN. Plus récemment, la famille des DNMT3 a été caractérisée. Ces enzymes ayant une préférence similaire pour l'ADN hémi- ou non-méthylé, elles sont donc en charge de la méthylation '*de novo*' (figure 14).

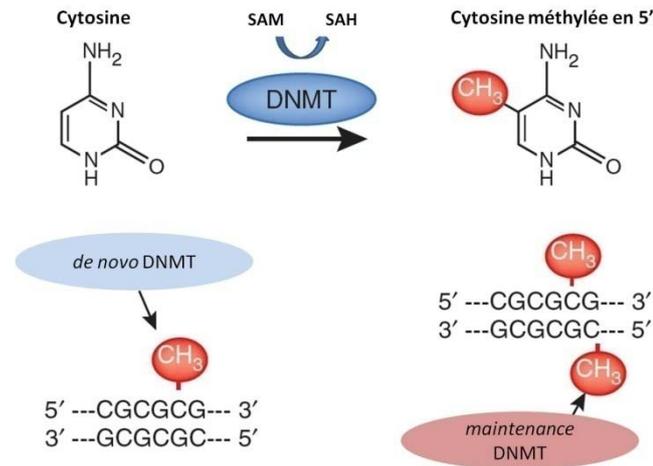


Figure 14 : Réaction de méthylation de l'ADN qui consiste en l'ajout d'un groupe méthyle au niveau des bases cytosines par les DNMTs. La réaction se fait grâce au donneur de méthyle, la S-adenosyl-méthionine (SAM), qui est ensuite transformée en S-adenosyl-homocystéine (SAH). Il existe une DNMT *de maintenance*, ayant une préférence pour l'ADN hémiméthylé, et des *de novo* DNMTs (adaptée de Day et Sweatt, 2010).

En ce qui concerne leur fonction, ces DNMTs sont notamment responsables de l'établissement des profils de méthylation lors du développement embryonnaire et interviennent au cours des vagues de re-méthylation (Li, 2002). Elles sont responsables de la méthylation allèle-spécifique des gènes à empreinte parentale (*imprinting*) et participent au processus d'inactivation du chromosome X chez la femelle (Li et coll., 1992 ; 1993 ; Beard et coll., 1995 ; Li, 2002).

De manière générale, la méthylation de l'ADN au niveau de la région promotrice d'un gène est associée à une répression transcriptionnelle (Robertson et Wolffe, 2000). En effet, elle masque l'ADN et inhibe ainsi, de façon directe, la fixation des facteurs de transcription (Watt et Molloy, 1988). Elle permet par ailleurs le recrutement de protéines de la famille des *methyl-CpG binding proteins* (MBPs) (Bird, 2002). En se fixant sur les CpG méthylés, ces MBPs, comme la *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2), entraînent le recrutement d'importants complexes protéiques formés notamment d'*histones deacetylases* (HDACs) et d'*histones methyltransferases* (HMTs). Ces différents facteurs agissent de concert pour favoriser la compaction de la chromatine et permettre ainsi un deuxième niveau de répression transcriptionnelle (Miller et coll., 2008). Il existe donc une coopération entre la méthylation de l'ADN et d'autres types de modifications épigénétiques, comme la déacétylation et la méthylation des histones, pour assurer la répression de l'expression des gènes (figure 15).

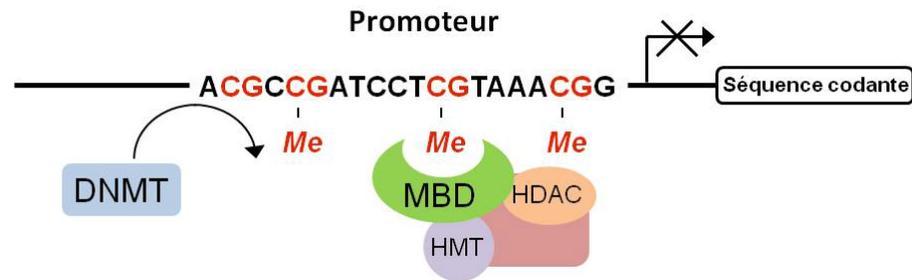


Figure 15 : Schéma représentatif de la coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones comme la déacétylation et la méthylation catalysées, respectivement, par les HDACs et les HMTs.

Du fait de son rôle dans les processus d'empreinte parentale (*imprinting*) et d'inactivation du chromosome X, la méthylation de l'ADN a longtemps été considérée comme une modification robuste et stable. Pourtant, il paraît maintenant clair que ce processus est dynamique et réversible (Miller et Sweatt, 2007). Par exemple, lors de la formation d'un souvenir, on note une augmentation de la méthylation au niveau des promoteurs de gènes considérés comme suppresseurs de mémoire (*protéine phosphatase 1*) associée à une déméthylation des promoteurs de gènes impliqués dans la plasticité synaptique (*reeline*). Les mécanismes précis sous-tendant cette déméthylation sont peu connus. L'importante stabilité du groupe cytosine méthylé laisse suggérer que cette déméthylation s'effectue, au préalable, *via* une étape de déamination, suivie d'une étape d'excision (pour revue : Carey et coll., 2011). Des études récentes ont par ailleurs proposé que les DNMT3A et 3B pourraient également être impliquées dans les mécanismes de déméthylation de l'ADN (Kangaspeka et coll., 2008 ; Metivier et coll., 2008).

2.2. Différentes modifications post-traductionnelles des histones :

Dans quel but ?

Les modifications post-traductionnelles des histones ont essentiellement lieu au niveau de l'extrémité N-terminale riche en résidus lysine (K) et arginine (R) et donc chargée positivement. Ces extrémités N-terminales sont sujettes à plusieurs sortes de modifications : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou encore la sumoylation.

L'acétylation, la méthylation et la phosphorylation sont les mieux caractérisées. J'ai choisi d'introduire brièvement la méthylation et la phosphorylation des histones et d'aborder de façon plus détaillée l'acétylation des histones, à laquelle je m'intéresse plus particulièrement dans le cadre de ma thèse (figure 16).

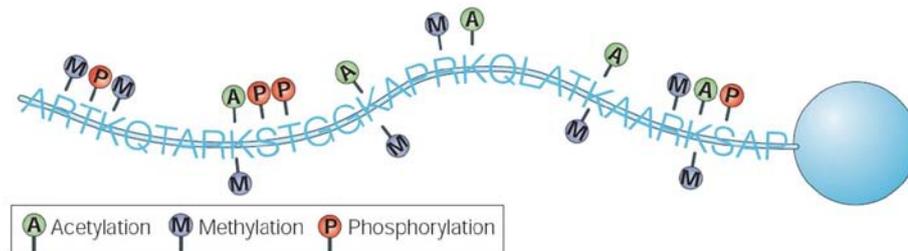


Figure 16 : Illustration des modifications des 30 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 chez l'Homme. Les différentes modifications (acétylation, méthylation, phosphorylation) s'effectuent au niveau de différents sites. L'intégration de l'ensemble de ces marques épigénétiques permet une régulation fine de la réponse transcriptionnelle (adaptée de Levenson et Sweatt, 2005).

2.2.1. Méthylation et phosphorylation des histones

La méthylation des histones s'effectue au niveau des résidus K et R. Elle peut être aussi bien associée à une activation qu'à une répression de la transcription (Klose et Zhang, 2007 ; Peters et Schubeler, 2005). En effet, les résidus R peuvent être mono- ou di-méthylés et les résidus K, mono-, di- ou encore tri-méthylés, et chacun de ces degrés de méthylation régule de manière différente l'expression des gènes. Ceci est notamment dû au degré d'affinité des protéines effectrices, comme les co-activateurs transcriptionnels par exemple, vis-à-vis de ces épitopes mono-, bi- ou tri-méthylés (Klose et Zhang, 2007). Par exemple, la tri-méthylation de H3K4 (H3K4me3) est associée à une activation transcriptionnelle alors que sa mono-méthylation (H3K4me) peut être associée aussi bien à une activation qu'à une répression de la transcription. D'autre part, la localisation de la méthylation dans une région génomique donnée joue également un rôle déterminant dans la régulation de la transcription (pour revue : Li et coll., 2007). Par exemple, les marques localisées à proximité du site d'initiation de la transcription, dans le cadre de lecture, vont avoir une plus grande influence sur la transcription que celles caractérisées par une localisation plus distale. D'un point de vue enzymatique, la méthylation des histones est catalysée par des HMTs spécifiques des résidus

K et R (Shilatifard, 2006). Cette réaction est réversible et le mécanisme de déméthylation des histones est assuré par des histones déméthylases (HDMs) comme la peptidylarginine déiminase (PADI), les histones déméthylases contenant un domaine jumonji-C (JMJC) et les déméthylases spécifiques des résidus lysine (LSDs) (Klose et Zhang Y, 2007) (figure 17).

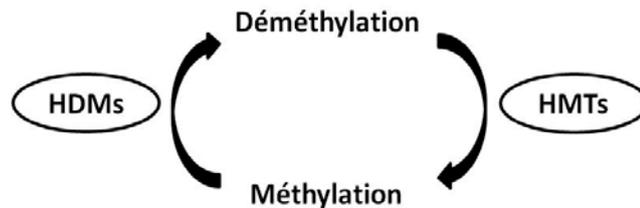


Figure 17 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la méthylation des histones.

La phosphorylation des histones s'effectue au niveau des résidus serine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y), et est, la plupart du temps, associée à une activation transcriptionnelle (Loury et Sassone-Corsi, 2003). En effet, la charge négative apportée par le groupement phosphate crée une force répulsive entre l'histone et l'ADN (également chargé négativement), ce qui provoque donc le relâchement de la chromatine. Cette réaction est catalysée par des protéines kinases (PKs) et la réaction inverse, la déphosphorylation des histones, par des protéines phosphatases (PPs) (Grant, 2001) (figure 18).

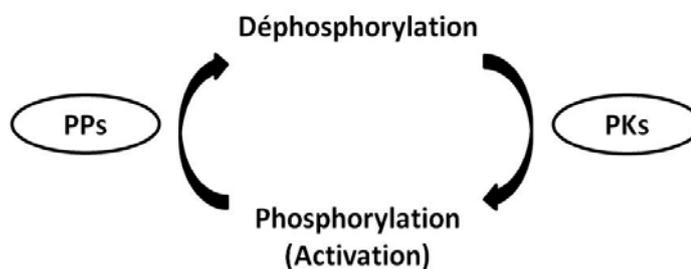


Figure 18 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la phosphorylation des histones.

Il est important de noter le caractère réversible de ces modifications, qui leur confère ainsi une dynamique indispensable à une régulation fine de la transcription.

2.2.2. Acétylation des histones

L'acétylation des histones est une modification covalente et réversible, qui est associée, en règle générale, à une activation transcriptionnelle. Ce mécanisme consiste en l'addition chimique d'un groupement acétyle (COCH₃) au niveau d'un résidu K, chargé positivement. L'ajout du groupement acétyle neutralise cette charge positive, ce qui provoque une modification des interactions électrostatiques entre l'ADN (chargé négativement) et les histones (figure 19). Ceci entraîne alors l'ouverture de la structure chromatinienne et de ce fait rend l'ADN plus accessible à la machinerie transcriptionnelle (Strahl et Allis, 2000). De plus, l'acétylation des histones au niveau des extrémités N-terminales favorise également la fixation de protéines additionnelles impliquées dans la transcription des gènes (Jenuwein et Allis, 2001 ; Strahl et Allis, 2000). L'acétylation des histones induit donc une activation de la transcription à la fois *via* un remodelage de la chromatine et un recrutement de co-facteurs transcriptionnels.

L'acétylation des histones est catalysée par les histones acétyltransférases (HATs). La réaction inverse, la déacétylation, est quant à elle assurée par les HDACs (figure 19).

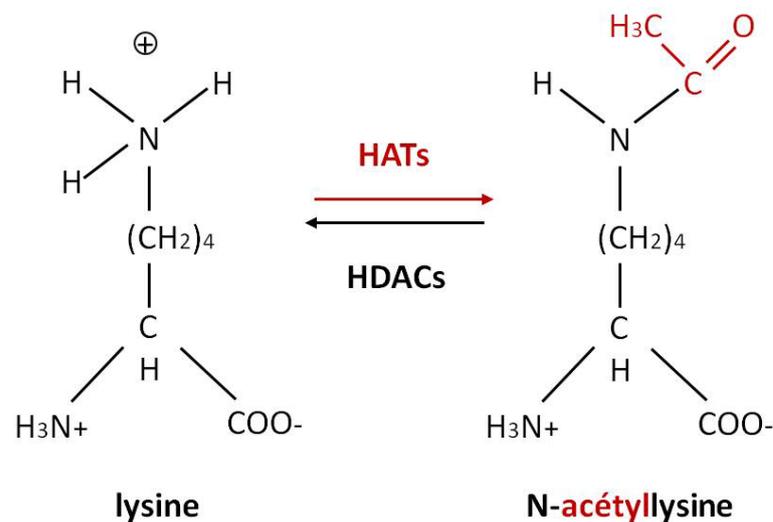


Figure 19 : Représentation schématique des enzymes impliquées dans la régulation de la réaction d'acétylation des histones.

2.2.2.1. Histones déacétylases (HDACs)

Chez les mammifères, on dénombre 18 protéines HDACs regroupées en 4 classes (Classes I à IV) basées notamment sur leur fonction et leur localisation subcellulaire (Gregoretto et coll., 2004). La classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) est constituée de protéines strictement nucléaires. La classe II peut être subdivisée en deux sous-classes : la classe IIa (HDAC4, 5, 7, 9) et la classe IIb (HDAC6 et HDAC10). Ces protéines transitent entre le cytoplasme et le noyau. Elles peuvent être régulées par phosphorylation *via* la CaMKII, ce qui favorise leur localisation nucléaire (Bucks et coll., 2006 ; Gregoretto et coll., 2004 ; Ellis et coll., 2003). HDAC11 comporte des homologies de séquence avec les deux classes précédentes mais est pourtant le seul membre de la classe IV (de Ruijter et coll., 2003). Les HDACs des classes I, II et IV ont toutes une activité enzymatique dépendante de la présence du cofacteur Zinc (Zn^{2+}). En ce qui concerne les HDACs de la classe III, elles appartiennent toutes à la famille des sirtuines (sirtuines 1 à 7) et se caractérisent par une activité déacétylase dépendante du cofacteur *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+). Elles peuvent être cytoplasmiques (Sirt1 et 2), nucléaires (Sirt1, 6 et 7) ou encore mitochondriales (Sirt3, 4 et 5).

2.2.2.2. Histones acétyltransférases (HATs)

Les HATs catalysent l'acétylation des histones au niveau des résidus K, c'est pourquoi elles sont également appelées KAT pour K acétyltransférases. La réaction d'acétylation des histones s'effectue *via* le transfert d'un groupement acétyle ($COCH_3$), à partir du cofacteur acétyl-Coenzyme A (Acetyl-CoA), vers le groupement amine des résidus K. Les acétyltransférases (ATs) sont également capables d'acétyler des protéines non histones comme des facteurs de transcription par exemple (Lee et Workman, 2007). Les ATs peuvent être divisées en 2 groupes selon leur localisation subcellulaire : les ATs nucléaires de type A et les ATs cytoplasmiques de type B (Roth et coll., 2001). Chacun de ces groupes est composé de différents membres appartenant à des familles enzymatiques distinctes, à la fois par leur séquence et par la spécificité de leurs sites de modification (figure 20).

HAT families.

HAT/KAT family	Representative members	Histone modification
Type A HAT (nuclear HAT)		
1) GNAT family	GCN5/KAT2A, PCAF/KAT2B ELP3/KAT9	H3K9, K14, K18, H2B H3, H4 acetylation
2) p300/CBP family	CBP/KAT3A, p300/KAT3B	H3K9, K14, K18, H2B H2AK5, H2BK12, K15
3) MYST family	TIP60/KAT5, MOZ/KAT6A, MORF/KAT6B, HBO1/KAT7, HMOF/KAT8	H4K5, K8, K12, K16 H3K14 H4K5, K8, K12 H4K16
4) Transcription factor related	TFIIIC90/KAT12, TAF1/KAT4	H3K9, K14, K18 H3, H4 acetylation
5) Nuclear receptor associated	SCR1/KAT13A, ACTR/KAT13B	H3/H4 acetylation
Type B HAT (cytoplasmic HAT)		
	HAT1/KAT1	H4K5, K12

Figure 20 : Classification des différentes HATs en fonction de leur localisation nucléaire (type A) ou cytoplasmique (type B). Pour les HATs nucléaires, les familles ainsi que les membres appartenant à ces familles sont représentés. Ces différents membres présentent des sites de modification caractéristiques (adaptée de Selvi et coll., 2010).

Brièvement, les HATs nucléaires sont réparties en 5 familles :

(1) la famille des GNAT (*GCN5-related acetyltransferases*), constituée de GCN5 (*General Control Nonderepressible 5*), PCAF (*p300/CBP associated factor*) et ELP3 (*Elongator complex protein 3*),

(2) la famille p300/CBP, composée de p300 et CBP,

(3) la famille MYST (*MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60*), composée des protéines MYST1 à MYST4 et de TIP60 (*Tat Interacting protein 60 KDa*),

(4) les HATs des facteurs de transcription, représentées par TFIIIC (*Transcription Factor IIIC*) et TAF1,

(5) les HATs associées aux récepteurs nucléaires, représentées par SRC (Steroid Receptor Coactivator) et ACTR/NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3).

Le groupe des HATs cytoplasmiques de type B est quant à lui composé de HAT1.

Nous allons nous focaliser sur PCAF, CBP et p300, qui m'intéressent plus particulièrement dans le cadre de ma thèse. En effet, comme nous le verrons dans la section suivante, ces différentes HATs sont toutes impliquées dans les processus de mémorisation.

2.2.2.2.a) Présentation de PCAF, CBP et p300

PCAF est un membre de la famille des GNAT. Son nom provient du fait qu'il est capable de s'associer à p300 et CBP *via* son extrémité N-terminale (Yang et coll., 1996 ; Xu et coll., 1998). Il fait partie d'un complexe stable de plusieurs sous-unités, qui comprend plus de 20 polypeptides (Ogryzko et coll., 1998).

Les membres de la famille des GNAT partagent plusieurs domaines fonctionnels : un domaine acétyltransférase en position centrale et un bromodomaine N-terminal qui permet d'interagir avec les protéines substrats (figure 21).

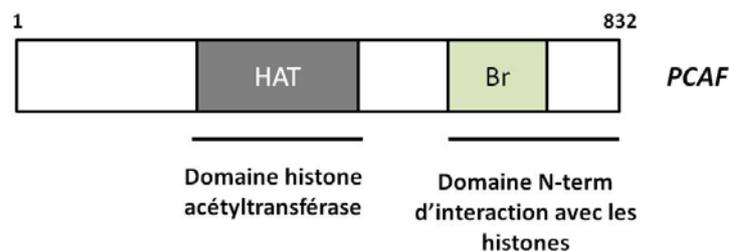


Figure 21 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de PCAF.

La famille des GNAT se caractérise par un mécanisme catalytique d'acétylation de type ternaire. En effet, la réaction implique la formation d'un complexe constitué à la fois des histones, de l'acétyl-CoA et de l'enzyme (appelé complexe ternaire). Ceci permet donc au résidu K de l'histone d'être au contact du cofacteur acétyl-CoA (Tanner et coll., 1999 ; Trievel et coll., 1999).

En ce qui concerne sa fonction, PCAF joue un rôle de coactivateur transcriptionnel. Il intervient également dans l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que dans les mécanismes de différenciation cellulaire des cellules en culture (Lehrmann et coll., 2002).

CBP et p300 sont les deux uniques membres de la famille p300/CBP (KAT3). Ce sont des régulateurs majeurs de l'expression des gènes, connus notamment pour interagir avec le facteur de transcription CREB. Exprimés de manière ubiquitaire, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Giordano et Avantaggiati, 1999 ; Goodman et Smolik, 2000).

La grande majorité des domaines fonctionnels de CBP et p300 est similaire entre ces deux enzymes. Elles possèdent notamment un domaine d'interaction au récepteur nucléaire (RID), un domaine KIX d'interaction à de nombreux facteurs de transcription comme CREB et MYB, des régions riches en cystéine/histidine (CH1-CH3) et un domaine IBiD (*interferon response-binding domain*). CBP et p300 possèdent également un domaine acétyltransférase et un bromodomaine qui fixe les K acétylés (figure 22) (Bordoli et coll., 2001 ; Kalkhoven et coll., 2002).

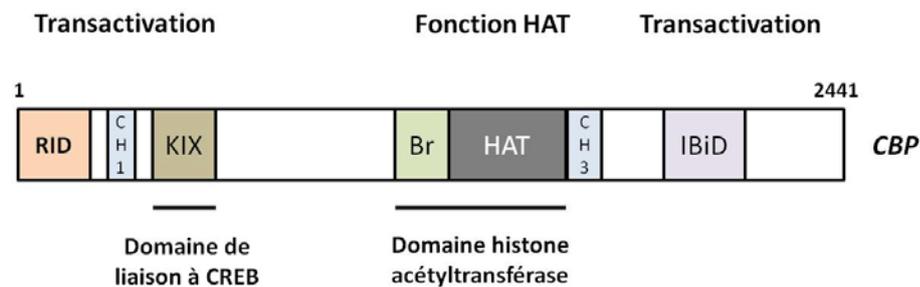


Figure 22 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels de CBP. Les domaines fonctionnels de CBP sont indiqués, incluant le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (RID), les régions riches en cystéine/histidine (CH1-CH3), le domaine KIX de liaison à CREB, le bromodomaine (Br) et le domaine IBiD. Les domaines N-terminal et C-terminal de p300/CBP peuvent agir par transactivation. Le domaine acétyltransférase est localisé dans la région centrale.

En ce qui concerne le mécanisme enzymatique de CBP et p300, celui-ci nécessite la formation de complexes intermédiaires enzyme/substrat. Il n'y a donc pas de formation d'un complexe ternaire (Liu et coll., 2008).

2.2.2.2.b) Régulation fine de l'activité des HATs PCAF, CBP et p300

Pour être fonctionnelles, ces différentes HATs doivent être activées. La régulation de l'activation de ces HATs semble faire intervenir différents mécanismes. Elles peuvent s'activer de manière autonome par autoacétylation. L'autoacétylation de p300 par exemple permet l'accès des substrats à leur site de fixation au niveau de l'enzyme, ce qui entraîne son activation (Thompson et coll., 2004). Il a par ailleurs été démontré que certaines HATs peuvent être déacétylées par des HDACs. PCAF peut ainsi être déacétylé par HDAC3 (Gregoire et coll., 2007), et p300, par l'HDAC dépendante du NAD⁺, SIRT2 (Black et coll., 2008). Ceci suggère donc l'existence d'un rétrocontrôle négatif de l'activation autonome de ces HATs. Enfin, certaines HATs peuvent également être régulées par phosphorylation. L'activation de CBP par exemple peut être induite par phosphorylation *via* l'activation de CaMK dépendantes de la voie AMPc (Chawla et coll., 1998 ; Hardingham et coll., 1999). Bien que l'implication fonctionnelle de ces mécanismes de régulation soient, à l'heure actuelle, peu documentée, il paraît clair que l'activation de ces enzymes nécessite une régulation fine.

Des études récentes suggèrent l'importance des HATs, et en particulier de CBP, dans la formation de la mémoire (Barrett et Wood, 2008). Cette idée est renforcée par le fait qu'on observe une perte de l'activité HAT au cours d'un vieillissement pathologique, comme la maladie d'Alzheimer (Rouaux et coll., 2004 ; Saha et coll., 2006). De façon plus générale, il est maintenant reconnu que les modifications épigénétiques interviennent dans les processus de plasticité et dans la formation de la mémoire (Graff et Mansuy, 2008).

Dans la prochaine partie, nous allons donc nous intéresser à un certain nombre de données récentes, qui témoignent de l'importance des modifications épigénétiques dans les processus de plasticité synaptique qui se mettent en place suite à un apprentissage.

II- Modifications épigénétiques, transcription de gènes et mémoire

1. Méthylation de l'ADN et processus mnésiques

1.1. Changements dynamiques de la méthylation de l'ADN dans l'encéphale adulte et consolidation de la mémoire

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, la méthylation de l'ADN est avant tout connue pour son rôle primordial dans les processus d'empreinte parentale qui se mettent en place au cours du développement embryonnaire ou encore pour son implication dans l'inactivation du chromosome X chez la femelle. C'est pourquoi, elle a longtemps été considérée comme une modification stable et robuste. Pourtant, des études récentes dans le domaine des Neurosciences ont mis en évidence l'existence de changements dynamiques de la méthylation de l'ADN, et ce dans le système nerveux adulte.

Des études *in vitro* ont par exemple montré un lien entre LTP et changements dynamiques de la méthylation de l'ADN. Une dépolarisation synaptique induit en effet une diminution des niveaux de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs du *bdnf*, ce qui favorise sa dérégulation transcriptionnelle. La dépolarisation est par ailleurs capable de provoquer le détachement de MeCP2 des promoteurs du *bdnf* auxquels il était fixé en condition basale, ce qui participe également à l'activation de la transcription du *bdnf* (Chen et coll., 2003 ; Martinowich et coll., 2003). A l'inverse, l'inhibition des DNMTs empêche l'induction de la LTP *in vitro* et est associée dans l'hippocampe à une modification des profils de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de la *reeline* et du *bdnf*, deux gènes fortement impliqués dans les processus de plasticité synaptique (Levenson et coll., 2006). Ces études soulignent donc le lien entre méthylation de l'ADN et LTP. Elles montrent également que, dans le système nerveux adulte, des changements dynamiques de la méthylation de l'ADN interviennent dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique.

Des études *in vivo* ont quant à elles montré des modifications de la méthylation de l'ADN dans l'hippocampe en réponse à un apprentissage. Suite à un CFC, on observe des changements rapides (0.5-2h après le CFC) au niveau de l'activité des DNMTs, associés à une

modification des profils de méthylation des promoteurs de la *reeline*, de la *protéine phosphatase 1 (pp1)* et du *bdnf*, gènes régulateurs de la mémoire (Miller et Sweatt, 2007 ; Lubin et coll., 2008). De façon intéressante, on peut noter suite à l'apprentissage une régulation exon-spécifique des transcrits du *bdnf* qui s'explique, en partie, par une méthylation différentielle au niveau de chacun de ses promoteurs. Cette régulation du *bdnf* dépend de l'activation de la voie de signalisation issue des récepteurs NMDA. En effet, l'inhibition des récepteurs NMDA empêche la régulation de la transcription du *bdnf* dépendante de la méthylation de l'ADN suite à l'apprentissage (Lubin et coll., 2008). Ces changements des profils de méthylation des promoteurs sont transitoires et réversibles, puisque le 'niveau de base' (correspondant aux animaux contrôles) est à nouveau atteint 24h après l'apprentissage (Miller et Sweatt, 2007 ; Lubin et coll., 2008).

Par ailleurs, l'utilisation de modèles knock-out conditionnels inductibles, mutés pour DNMT1 et/ou 3A dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur, a permis de montrer que l'activité combinée de DNMT1 et 3A au sein de l'hippocampe est nécessaire aussi bien à la LTP qu'à la formation de la mémoire, comme la mémoire spatiale et la mémoire de peur au contexte (Feng et coll., 2010). En plus d'appuyer l'importance de la méthylation de l'ADN dans la plasticité synaptique et l'apprentissage, ce résultat suggère un rôle complémentaire des enzymes DNMT1 et 3A dans ces processus.

De manière générale, l'ensemble de ces résultats témoignent de l'importance de la méthylation de l'ADN dans les processus de plasticité synaptique et d'apprentissage, *via* son intervention dans la régulation de gènes comme le *bdnf*.

1.2. Méthylation de l'ADN et stockage à long terme de la mémoire

Nous avons discuté précédemment de l'aspect dynamique et transitoire de la méthylation de l'ADN dans l'hippocampe pendant la formation de la mémoire. Néanmoins, une étude récente de Miller et collaborateurs a permis de mettre en évidence des changements durables de la méthylation de l'ADN dans le cortex préfrontal de Rat, 1 mois après le CFC. En effet, la méthylation de l'ADN du gène de la *calcineurine* (répresseur de mémoire) persiste 30 jours après l'apprentissage. Par ailleurs, un traitement (29 jours après l'apprentissage) avec différents agents déméthylants entraîne des déficits au niveau de la mémoire ancienne, testée 30 jours après la fin de l'apprentissage (Miller et coll., 2010). Ces données suggèrent donc

que la méthylation de l'ADN interviendrait également dans le stockage à plus long terme des souvenirs, et ce *via* des modifications stables des profils de méthylation de certains gènes. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN contribue à la consolidation et au stockage des souvenirs.

L'expression de nombreux gènes est modifiée lors des phases d'apprentissage et de consolidation. Néanmoins, la méthylation de l'ADN n'est pas la seule modification épigénétique mise en jeu dans la régulation de l'expression de ces gènes. En effet, comme nous l'avons vu dans la section précédente, différents types de modifications épigénétiques agissent de concert pour remodeler la structure de la chromatine et conditionner ainsi le microenvironnement d'un promoteur donné afin d'activer ou réprimer la transcription du gène. Dans la prochaine partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement à un autre mécanisme épigénétique, l'acétylation des histones, et à son implication majeure dans les processus mnésiques.

2. Acétylation des histones et consolidation de la mémoire

2.1. Implication des HATs dans les mécanismes de mémorisation

Plusieurs travaux récents utilisant des modèles transgéniques ont mis en évidence l'implication de l'activité HAT, notamment celle de CBP, dans la formation de la mémoire à long terme chez le rongeur (pour revues: Barrett et Wood, 2008; Hallam et Bourchouladze, 2006).

Les premières données ont été obtenues sur des souris *cbp*^{+/-}. En effet, au cours de la caractérisation de ces souris, proposées à la base pour modéliser le syndrome de Rubinstein-Taybi (pathologie du développement chez l'Homme), Oike et collaborateurs ont observé des déficits au niveau des processus de mémorisation (Oike et coll., 1999). Par la suite, plusieurs études ont été réalisées sur ce même modèle et toutes ont montré des troubles de la mémoire à long terme chez ces animaux, et ce dans différentes tâches d'apprentissage comme le test de

reconnaissance d'objets par exemple (Oike et coll., 1999; Bourtchouladze et coll., 2003; Alarcon et coll., 2004).

Avec l'évolution des techniques, des modèles transgéniques plus élaborés se sont développés, permettant ainsi d'éviter les biais liés aux problèmes développementaux rencontrés chez les souris *cbp*^{+/-}. L'utilisation de modèles transgéniques induisant la perte sélective de l'activité HAT de CBP dans le cerveau antérieur, à l'âge adulte, a permis de mettre en évidence chez ces animaux des déficits sévères au niveau de la phase de maintenance de la LTP hippocampique (I-LTP) ainsi que des troubles de la mémoire à long terme dans différents tests. On note par exemple chez ces souris des performances déficitaires en MWM lors d'un test de rétention effectué 24h après la fin de l'acquisition (Korzus et coll., 2004 ; Wood et coll., 2005). Ces données soulignent donc l'importance de la fonction HAT de CBP dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire à long terme (Korzus et coll., 2004). Il est par ailleurs intéressant de noter que le domaine KIX de CBP (domaine de liaison au facteur de transcription CREB) joue également un rôle majeur dans les processus de mémorisation (Wood et coll., 2006; Vecsey et coll., 2007; Stefanko et coll., 2009). En effet, on observe des déficits mnésiques chez des souris présentant une mutation du domaine KIX, associés à une baisse anormale de la transcription de certains gènes cibles de CREB, comme le *bdnf* (Wood et coll., 2006). Ceci confirme l'implication de CBP dans l'expression de gènes dont la transcription est activée par CREB durant la consolidation de la mémoire.

Dans une étude plus récente, Valor et collaborateurs ont montré un lien entre CBP, mémoire à long terme et acétylation des histones. En effet, dans un modèle conditionnel induisant une perte de CBP dans les neurones du cerveau antérieur, ils ont observé une baisse globale de l'acétylation des histones associée à une atteinte de la mémoire à long terme dans un test de reconnaissance d'objet, même si aucun déficit n'a été observé ni en MWM, ni dans un test de CFC (Valor et coll., 2011). Le même profil de résultats est obtenu lorsque la perte de CBP est limitée, grâce à l'utilisation d'adénovirus, à l'aire CA1 de l'hippocampe dorsal. En effet, Barrett et collaborateurs observent chez ces souris une baisse globale de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 dans CA1 ainsi que des déficits, d'une part, au niveau de la LTP, et d'autre part, au niveau de la mémoire à long terme à la fois dans un test de reconnaissance d'objet et dans le CFC. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les acétylations d'histones induites par CBP sont impliquées dans la consolidation et le maintien à long terme de certains types de souvenirs (Barrett et coll., 2011).

Même si la majeure partie des études précédemment citées se sont principalement focalisées sur le rôle de CBP dans la mémoire à long terme, la plupart d'entre elles ont également étudié la mémoire à court terme dans ces différents modèles transgéniques. Aucun déficit n'a alors été observé, ce qui est cohérent avec le fait que la transcription de gènes n'est pas requise dans ce type de mémoire (Oike et coll., 1999 ; Alarcon et coll., 2004 ; Korzus et coll., 2004 ; Wood et coll., 2005 ; Barrett et coll., 2011). Néanmoins, une étude réalisée sur un modèle conditionnel présentant une inactivation totale de CBP dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur a montré une atteinte aussi bien de la mémoire à long terme que de la mémoire à court terme (Chen et coll., 2010). Ces déficits de mémoire à court terme, bien que surprenants, pourraient s'expliquer par une perturbation du fonctionnement de base des synapses, perturbation qui n'est pas observée dans les études de Valor et al (2011) et de Barrett et al (2011). On note par exemple une baisse de l'expression basale de certains gènes impliqués dans l'induction de la LTP par exemple, comme les isoformes de la CaMK ainsi que certaines sous-unités des récepteurs glutamatergiques, qui pourrait contribuer aux déficits observés au niveau de la mémoire à court terme (Figure 23).

Il est important de préciser que d'autres protéines munies d'une fonction HAT, telles que p300, qui présente une forte homologie avec CBP (Oliveira et coll., 2006 ; 2007), et PCAF (Maurice et coll., 2008), sont également impliquées dans les processus de mémorisation. En effet, des souris knock-out conditionnelles exprimant une forme tronquée inactive de p300 (caractérisée par une perte de la partie C-terminale contenant la fonction HAT et des domaines de transactivation en C-terminal dans les neurones du cerveau antérieur) présentent des déficits de mémoire à long terme dans les tests de reconnaissance d'objets et de CFC, associés à une baisse globale des acétylations de l'histone H3 dans le cerveau antérieur (Oliveira et coll., 2007). En ce qui concerne les souris knock-out pour PCAF, il est intéressant de noter qu'elles présentent des troubles de la mémoire âge dépendants. En effet, des déficits de mémoire à court terme sont observés à l'âge de 2 mois alors que des déficits de mémoire à long terme n'apparaissent qu'à 6 mois et s'accroissent ensuite avec l'âge des souris. Ce modèle est caractérisé par une inactivation totale de PCAF dès la naissance, ce qui entraîne une altération de l'expression de gènes qui va directement affecter la signalisation moléculaire impliquée dans le processus de mémoire à court terme (Maurice et coll., 2008).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, les HATs comme CBP, qui reste la plus largement étudiée à ce jour, mais également p300 et PCAF jouent un rôle clé dans les processus de mémorisation, et plus particulièrement dans la mémoire à long terme. On peut imaginer que ces différentes enzymes sont capables d'agir de manière bien spécifique sur la structure de la chromatine, *via* l'acétylation des différentes histones, et d'orchestrer ainsi la régulation transcriptionnelle de gènes nécessaires à la formation de la mémoire à long terme dans l'encéphale adulte.

Mutations	Déficits de plasticité et de mémoire à long terme	Etat des acétylations des histones	Références
CBP tronquée (dominant négatif)	Conditionnement de peur au son Evitement passif		Oike <i>et al</i> , 1999
	Reconnaissance d'objets		Bourtchouladze <i>et al</i> , 2003
CBP knockout (cbp +/-)	Conditionnement de peur au contexte(CFC) Reconnaissance d'objets L-LTP	Baisse acétylation H2B	Alarcon <i>et al</i> , 2004
CBP $\Delta 1$ forme tronquée de CBP (cerveau antérieur)	Piscine de Morris (MWM) CFC L-LTP		Wood <i>et al</i> , 2005
CBP HAT- (cerveau antérieur)	Reconnaissance d'objets MWM		Korzus <i>et al</i> , 2004
CBP KIX/KIX (non inductible)	Reconnaissance d'objets CFC		Wood <i>et al</i> , 2006
CBP ko conditionnel (cerveau antérieur)	MWM CFC Reconnaissance d'objets + Déficits de la mémoire à court terme		Chen <i>et al</i> , 2010
CBP ko conditionnel (cerveau antérieur)	Reconnaissance d'objets	Baisse globale des acétylations des histones	Valor <i>et al</i> , 2011
CBP ko conditionnel Adénovirus (CA1 de l'hippocampe)	Reconnaissance d'objets CFC LTP	Baisse des acétylations H2B, H3, et H4	Barrett <i>et al</i> , 2011

Figure 23 : Tableau récapitulatif des déficits de plasticité et de mémoire à long terme observés dans différents modèles transgéniques pour CBP.

2.2. Acétylation des histones, plasticité synaptique et mémoire

Dans la partie précédente, on a pu constater que lorsque l'on interfère *via* des modèles transgéniques avec les enzymes permettant l'acétylation des histones, cela se traduit par des modifications des niveaux d'acétylation des histones associées à des troubles de la mémoire à long terme. D'autres études se sont quant à elles intéressées directement aux effets d'un apprentissage sur l'acétylation des histones (pour revue : Levenson et Sweatt, 2005). Les premiers travaux ont été réalisés par Levenson et collaborateurs en 2004 et montrent une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe (CA1) 1h après un apprentissage associatif de type CFC. L'augmentation de l'acétylation de H3 n'est plus observée lorsque les animaux sont traités avec un antagoniste des récepteurs NMDA ou avec un inhibiteur de la kinase Erk (appartenant à la voie des MAPK). Cette augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dépend donc de la voie de signalisation intracellulaire impliquant les récepteurs NMDA et la kinase Erk, acteurs cruciaux dans les processus de plasticité synaptique et de consolidation de la mémoire (Levenson et coll., 2004). Ces résultats sont confirmés par d'autres études, qui montrent que l'activation de la kinase Erk *via* la PKC ou la PKA entraîne une augmentation de l'acétylation de H3 (Brami-Cherrier et coll., 2007 ; 2009 ; Reul et coll., 2009). Cette augmentation de l'acétylation de l'histone H3 est associée à une augmentation de sa phosphorylation sur la sérine 10 (H3S10), dépendante elle aussi de la voie Erk/MAPK (Sweatt, 2001 ; Chwang et coll., 2006). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'on intervient à un autre niveau de la voie des MAPK. En effet, des souris mutées pour la *Mitogen- and stress-activated kinase 1* (MSK1) présentent des troubles de la mémoire de peur et de la mémoire spatiale accompagnés d'une diminution des niveaux d'acétylation et de phosphorylation de l'histone H3 (Chwang et coll., 2007). L'ensemble de ces études met donc en évidence une interaction entre la voie de signalisation Erk/MAPK et la machinerie épigénétique en réponse à un apprentissage, ce qui aboutit *in fine* à la régulation de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique (figure 24). Par exemple, l'acétylation ainsi que la phosphorylation de H3 sont rapidement (2 min) augmentées au niveau du promoteur de *CREB* suite à un apprentissage dans une tâche de reconnaissance d'objets, ce qui est corrélé à son activation transcriptionnelle (Koshibu et coll., 2009).

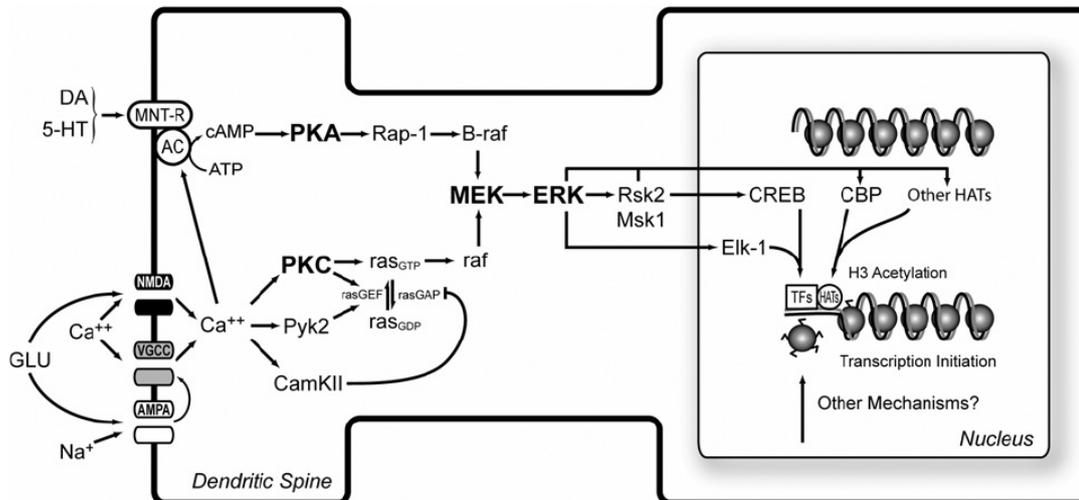


Figure 24 : Schéma hypothétique des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de la chromatine *via* l'acétylation des histones dans l'hippocampe, en réponse à un apprentissage. Une grande variété de récepteurs membranaires est couplée à des cascades de signaux intracellulaires. Ces voies de signalisation permettent l'activation de Erk, ce qui entraîne des changements au niveau de facteurs de transcription comme CREB et de coactivateurs comme CBP. Le recrutement de CBP induit un remodelage de la chromatine, *via* l'acétylation des histones et participe ainsi à la mise en place de programmes génétiques impliqués dans la mémoire. MNT-R, *modulatory neurotransmitter receptor*; VGCC, *voltage-gated calcium channel*; AC, *adenylate cyclase* (adaptée de Levenson et Sweatt, 2005).

Il est intéressant de noter que l'hyperacétylation de l'histone H3 induite par l'apprentissage a pu être détectée au niveau global dans l'hippocampe, grâce à la technique de *western blot* (Levenson et coll., 2004), ce qui suggère une réorganisation significative de la structure de la chromatine suite à l'apprentissage, permettant certainement la régulation de nombreux gènes.

Enfin, il est important de souligner l'aspect transitoire de ces changements. En effet, l'augmentation de l'acétylation de H3 est observée 1h mais pas 24h après le conditionnement (Levenson et coll., 2004). Ces changements transitoires d'acétylation de l'histone H3 lors de la formation de la mémoire ont été retrouvés chez la Souris suite à différents types d'apprentissage dépendant de l'hippocampe (Fischer et coll., 2007 ; Koshibu et coll., 2009 ; Vecsey et coll., 2007).

La régulation des acétylations d'histones en réponse à un apprentissage n'est pas limitée à H3. Une augmentation de l'acétylation de l'histone H4, en plus de celle de H3, a également été mise en évidence en réponse au CFC (Francis et coll., 2009 ; Peleg et coll., 2010).

Des études réalisées avec des inhibiteurs de HDACs viennent appuyer ces données et confirment l'aspect dynamique de l'acétylation/déacétylation des histones dans la consolidation de la mémoire. L'augmentation de l'acétylation des histones par des inhibiteurs de HDACs (HDACi) entraîne une augmentation de la LTP ainsi qu'une amélioration de la mémoire à long terme dans un test de CFC (Levenson et coll., 2004). L'effet bénéfique des HDACi sur les capacités mnésiques a été confirmé dans plusieurs types de tâches (pour revue : Graff et coll., 2011). L'utilisation d'HDACi permet par exemple de restaurer les capacités de mémoire spatiale à long terme dans un modèle transgénique de neurodégénérescence. Il a par ailleurs été montré que cette amélioration des capacités mnésiques était associée à une hyperacétylation globale des histones H3 et H4 (Fischer et coll., 2007). Ces effets pourraient être dus à l'implication de HDACs particulières. En effet, des souris qui surexpriment HDAC2 dans l'hippocampe présentent des déficits d'induction et de maintenance de la LTP ainsi que des déficits de mémoire à long terme dans le CFC (Guan et coll., 2009). Plus récemment, un modèle transgénique knock-out conditionnel pour HDAC3 dans l'hippocampe dorsal (CA1) montre une amélioration de la mémoire à long terme (reconnaissance d'objets), associée à une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 (H4K8) et à une augmentation de la transcription de gènes précoces comme *c-fos* 2h après l'apprentissage (McQuown et coll., 2011).

2.3. Mémoire et modifications des histones sur 'les promoteurs' du *bdnf*

Nous venons donc de voir qu'un apprentissage induit des changements dynamiques d'acétylation des histones, qui se mettent en place suite à l'activation de cascades intracellulaires spécifiques, comme la voie de signalisation impliquant les récepteurs NMDA et la voie Erk/MAPK. L'activation de ces différentes voies permet en effet le recrutement de facteurs de transcription, comme CREB par exemple, au niveau des promoteurs de gènes particuliers, impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de consolidation. Des

coactivateurs transcriptionnels comme CBP ou d'autres HATs sont alors recrutés au niveau de ces promoteurs, ce qui favorise un remodelage de la structure de la chromatine *via* l'acétylation des histones (voir figure 24 page 60). Les modifications épigénétiques induites en réponse à l'apprentissage permettent ainsi un deuxième niveau de régulation de l'expression de ces gènes impliqués dans la mémoire, comme le *bdnf* par exemple.

Les premières études sur les mécanismes transcriptionnels mis en jeu dans la régulation de l'expression du *bdnf* dans l'encéphale, se sont intéressées au rôle des facteurs de transcription, comme CREB et NF- κ B. En effet, tous deux sont susceptibles de se fixer au niveau des différents promoteurs du *bdnf* et d'induire alors le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Des études plus récentes ont mis en évidence un autre niveau de régulation de la transcription du *bdnf*, impliquant des modifications de la structure de la chromatine. En effet, les modifications épigénétiques qui se mettent en place au niveau des différents promoteurs du *bdnf*, et en particulier l'acétylation des histones, semblent jouer un rôle majeur dans les fonctions cérébrales adultes, comme les processus d'apprentissage et de consolidation par exemple (pour revue : Lubin, 2011).

Une dépolarisation neuronale induite par le NMDA entraîne une augmentation de la transcription du *bdnf* dans des cultures de neurones (Marini et coll., 1998 ; Marmigère et coll., 2001 ; Tian et coll., 2009). Dans des cultures d'hippocampe, cette augmentation de la transcription du *bdnf* en réponse au NMDA résulte d'une régulation préférentielle des transcrits contenant l'exon I, et dans une moindre mesure de ceux contenant l'exon IV (Tian et coll., 2010). En effet, le traitement au NMDA active de manière plus importante la transcription du *bdnf-I*. Ces effets sont associés à des modifications épigénétiques au niveau du promoteur I du *bdnf*, et notamment à une augmentation des acétylations de l'histone H3 sur K9 et K14 (H3K9/K14), au niveau de sites spécifiques de liaison aux facteurs de transcription CREB et NF- κ B (Tian et coll., 2009). Le traitement au NMDA induit d'autre part le recrutement de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B ainsi que le recrutement de CREB et CBP au niveau de ces sites de liaison présents sur le promoteur I du *bdnf*, ce qui témoigne de l'implication des facteurs de transcription CREB et NF- κ B et du coactivateur transcriptionnel CBP dans la régulation de la transcription du *bdnf-I* en réponse au NMDA (Tian et coll., 2009). Ces résultats sont d'ailleurs appuyés par ceux obtenus dans une étude *in vivo* réalisée par Lubin et collaborateurs en 2007, dans laquelle ils ont montré que l'activation du complexe NF- κ B (p50/p65) est impliquée dans la transcription du *bdnf-I*, induite en

réponse au kaïnate, un autre agoniste glutamatergique (Lubin et coll., 2007). L'ensemble de ces données suggère donc que la régulation de la transcription du *bdnf-I* suite à un traitement au NMDA fait intervenir d'une part le recrutement de facteurs de transcription comme CREB et NF- κ B au niveau de son promoteur, et d'autre part l'augmentation de l'acétylation des histones au niveau de ce même promoteur, ce qui favorise également l'activation de la transcription du *bdnf-I*.

Il est important de souligner que d'autres modifications post-traductionnelles des histones, comme la méthylation des histones, contribuent elles aussi à la régulation transcriptionnelle du *bdnf*. En effet, le traitement au NMDA induit également, au niveau du promoteur I du *bdnf*, une augmentation de la diméthylation de K4 de l'histone H3 (H3K4me2), une marque épigénétique associée à une activation transcriptionnelle (Tian et coll., 2009). Des études *in vivo* confirment d'ailleurs le rôle de la méthylation des histones dans la régulation de la transcription du *bdnf-I*. Une augmentation de la triméthylation de K4 de l'histone H3 est par exemple observée sur le promoteur I du *bdnf*, suite à un CFC (Gupta et coll., 2010).

Différentes études ont par ailleurs montré que cette expression différentielle des transcrits du *bdnf* est également induite *in vivo* en réponse à un apprentissage. Un CFC entraîne par exemple une augmentation sélective des transcrits I et IV du *bdnf* dans l'amygdale (structure impliquée dans les circuits de peur) mais aucun changement au niveau des transcrits II et VI (Rattiner et coll., 2004 ; Ou et Gean, 2007). Par contre, dans l'hippocampe, le CFC induit uniquement l'augmentation de la transcription du *bdnf-IV* (groupe contexte-plus-choc), et non celle du *bdnf-I*, qui lui semble plutôt répondre au contexte (groupe contexte seul). Cette augmentation de la transcription du *bdnf-IV* est associée à des modifications de la structure de la chromatine *via* une augmentation de l'acétylation et de la phosphorylation de l'histone H3, sur ce promoteur particulier (Lubin et coll., 2008). Ces travaux illustrent le rôle des modifications post-traductionnelles des histones, et notamment de l'acétylation, dans la régulation des différents transcrits du *bdnf*, en réponse à un apprentissage. Il est cependant important de rappeler que les modifications post-traductionnelles des histones ne sont pas les seules modifications épigénétiques mises en jeu dans la régulation différentielle de l'expression des transcrits du *bdnf* en réponse à l'apprentissage puisque la méthylation de l'ADN est également impliquée (voir partie Méthylation de l'ADN et processus mnésiques) (Lubin et coll., 2008).

Ces études confirment, tout d'abord, l'implication du *bdnf* dans la consolidation de la mémoire de peur au contexte. De plus, elles suggèrent une régulation précise et différentielle de ses transcrits à la fois selon la structure cérébrale observée et selon les conditions expérimentales étudiées (contexte seul *vs* contexte-plus-choc ; Lubin et coll., 2008). Enfin, elles montrent que cette régulation complexe dépend notamment des acétylations d'histones, qui, en agissant de manière complémentaire avec d'autres modifications épigénétiques, permettent la consolidation de la mémoire de peur au contexte. Il paraît cependant important d'étudier les profils d'expression des différents transcrits du *bdnf*, ainsi que les changements épigénétiques associés, dans d'autres tâches d'apprentissage afin d'associer ce type de régulation à un phénomène plus général d'apprentissage et de consolidation de la mémoire.

Dans leur ensemble, les différents travaux présentés indiquent clairement l'implication dynamique, dans le SNC adulte, des modifications épigénétiques dans les processus de plasticité synaptique et de consolidation de la mémoire, permettant ainsi une régulation fine de l'expression des gènes impliqués dans ces processus, comme le *bdnf* par exemple.

CHAPITRE 3

VIEILLISSEMENT

ET

MEMOIRE

CHAPITRE 3

VIEILLISSEMENT ET MEMOIRE

I- Impact du vieillissement sur les capacités mnésiques

1. Vieillissement et mémoire chez l'Homme

Le vieillissement est un processus multifactoriel déterminé par des facteurs génétiques et environnementaux, dans lequel on observe un déclin des fonctions endocriniennes, immunitaires et cognitives. Ce déclin fonctionnel s'aggrave avec l'âge. Bien qu'il paraisse évident que la plupart des individus présentent des altérations graduelles des capacités cognitives avec le temps, il est important de garder à l'esprit qu'il existe une grande variabilité inter-individuelle, qui dépend de facteurs personnels à la fois génétiques et environnementaux, liés au mode de vie de chacun (Albert et coll., 1995 ; Arbuckle et coll., 1992 ; Hultsch et coll., 1993 ; Emery et coll., 1995).

Au niveau de l'encéphale, le vieillissement s'accompagne de changements structuraux et fonctionnels. Ceux-ci n'étant pas uniformes, certaines fonctions cognitives comme l'attention et la mémoire par exemple sont plus touchées que d'autres (pour revue : Drag et Bieliauskas, 2010). Le déclin des capacités mnésiques avec l'âge m'intéresse plus particulièrement dans le cadre de ma thèse. Celui-ci est lié au fait que les régions impliquées dans les processus d'apprentissage et de mémoire, comme l'hippocampe et le cortex préfrontal, sont les structures les plus vulnérables lors du processus de vieillissement normal. Ceci explique notamment que les deux types de mémoire les plus touchés lors du vieillissement soient d'une part la mémoire déclarative/épisodique, qui fait intervenir la

structure hippocampique, et d'autre part la mémoire de travail/des fonctions exécutives, qui dépend elle du cortex préfrontal (pour revue : Burke et Barnes, 2006). Les altérations de la mémoire épisodique (mémoire des événements personnels associés à leur contexte spatial et temporel) sont dues à des déficits au niveau des processus d'encodage, de stockage et de récupération des informations (pour revue : Craik et Rose, 2011). Il est intéressant de préciser que la mémoire spatiale, considérée comme une composante majeure de la plupart des expériences épisodiques chez l'Homme, est également touchée lors du vieillissement normal (Montgomery et coll., 2000 ; pour revue : Moffat, 2009). Ceci est illustré par une étude de Wilkniss et collaborateurs (1997) dans laquelle ils ont demandé à des sujets de se souvenir d'un trajet effectué au préalable, de reconnaître des indices rencontrés tout au long du trajet, puis de les classer chronologiquement. Les sujets âgés sont toujours capables de reconnaître les indices, mais présentent des difficultés lorsqu'il s'agit de rappeler l'itinéraire emprunté et de classer les indices de manière chronologique (Wilkniss et coll., 1997).

Le déclin cognitif observé au cours du vieillissement normal peut être exacerbé dans des conditions pathologiques. En effet, le vieillissement constitue le facteur de risque majeur de survenue de la maladie d'Alzheimer (MA), une maladie neurodégénérative, qui conduit à un état démentiel chez les personnes âgées. La première caractéristique observable chez les patients Alzheimer est une altération progressive des capacités mnésiques. Ce déclin s'accompagne d'autres atteintes cognitives comme des troubles du langage (aphasie), des troubles de la réalisation de gestes complexes (apraxie) et des troubles de reconnaissance (agnosie). Ces différents symptômes constituent le syndrome aphaso-apraxo-agnosique. Les premières structures cérébrales touchées lors de la MA sont le cortex entorhinal et l'hippocampe. Les lésions s'étendent ensuite aux aires corticales associatives, puis unimodales et enfin primaires. En ce qui concerne les déficits mnésiques observés dans la MA, le fait que l'hippocampe soit touché à un stade précoce de la maladie explique que les perturbations mnésiques se manifestent au départ par une atteinte de la mémoire épisodique (Storey et coll., 2002) et notamment des capacités d'orientation spatiale (Dubois et coll., 1997). L'étendue des lésions aux aires corticales s'accompagne de l'apparition de perturbations au niveau d'autres types de mémoire, comme la mémoire de travail et la mémoire sémantique.

La compréhension des mécanismes impliqués dans le déclin cognitif observé lors du vieillissement normal semble être un pré-requis crucial dès lors que l'on projette d'étudier les mécanismes mis en jeu dans le vieillissement pathologique.

2. Vieillessement et mémoire chez le Rongeur

Le Rongeur de laboratoire constitue un modèle de choix lorsque l'on étudie l'impact du vieillissement sur les fonctions cognitives. Ceci est dû, d'une part, à son espérance de vie courte et, d'autre part, au développement de nombreux tests adaptés à l'évaluation précise de ses performances cognitives.

Comme c'est le cas chez l'Homme, les rongeurs présentent une altération des fonctions cognitives avec l'âge, en particulier au niveau des performances attentionnelles et mnésiques (Gallagher et Burwell, 1989). Concernant plus particulièrement la mémoire, ces déficits mnésiques se retrouvent dans plusieurs tâches d'apprentissage dépendantes de l'hippocampe (Oler et Markus, 1998 ; Gallagher et coll., 2003). Par ailleurs, les déficits de mémoire spatiale liés à l'âge sont également observés chez le Rongeur (Gallagher et Rapp, 1997). C'est pourquoi un grand nombre d'études sur le vieillissement s'est focalisé sur la mémoire spatiale. On observe en effet des déficits dans la réalisation d'une tâche lorsque celle-ci nécessite l'utilisation de repères spatiaux, alors qu'aucun déficit n'est observé lorsque les performances sont guidées par des stimuli non-spatiaux (localisation d'une plate-forme indiquée dans le MWM par exemple) (Rapp et coll., 1987). De nombreuses études ont mis en évidence des déficits de mémoire spatiale dans le MWM (Gallagher et coll., 1993 ; Blalock et coll., 2003 ; Burger et coll., 2007 ; Rowe et coll., 2007 ; Cassel et coll., 2007 ; Burger et coll., 2008 ; Harati et coll., 2009). Les rats âgés ont en effet besoin d'un plus grand nombre d'essais pour apprendre la localisation d'une plate-forme immergée, alors qu'aucune différence n'est observée entre animaux jeunes adultes et animaux âgés dans une version du test où la plate-forme est visible. Les déficits de mémoire spatiale observés ne semblent donc pas être attribuables aux atteintes motrices et sensori-motrices observables avec l'âge (Gage et coll., 1989), mais plutôt à des déficits au niveau de la stratégie de type allocentrique (Barnes et coll., 1997). En effet, les rats âgés utilisent préférentiellement une stratégie non-spatiale de type égocentrique pour retrouver la plate-forme immergée (Rapp et coll., 1987).

Il est intéressant de noter que le vieillissement s'accompagne également d'une dérégulation de certains paramètres physiologiques, qui pourrait contribuer aux déficits mnésiques liés à l'âge. On observe par exemple, lors du vieillissement, une altération de la réponse au stress.

Le terme 'stress' peut être utilisé pour définir un évènement ou une succession d'évènements, de nature physique ou psychologique, agressif(s) ou non, qui perturbe(nt) l'homéostasie et entraîne(nt) une réponse de l'organisme dans le but de restaurer l'homéostasie. Cette réponse au stress de l'organisme fait notamment intervenir l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA : *hypothalamic pituitary adrenal*). En effet, un stimulus considéré comme stressant par l'organisme provoque une activation transitoire de l'axe HPA, ce qui aboutit à la libération d'hormones de stress, dont les glucocorticoïdes font partie (GC : cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le Rongeur). Ces GC agissent sur différents organes, *via* deux types de récepteurs, les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (McEwen et coll., 1986), et permettent ainsi une réponse coordonnée, favorable à l'adaptation de l'organisme au stress. Il est important de préciser que les GC régulent l'activité de l'axe HPA par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, ce qui permet d'éviter un éventuel 'emballement' du système et favorise le retour à l'activité basale (figure 25).

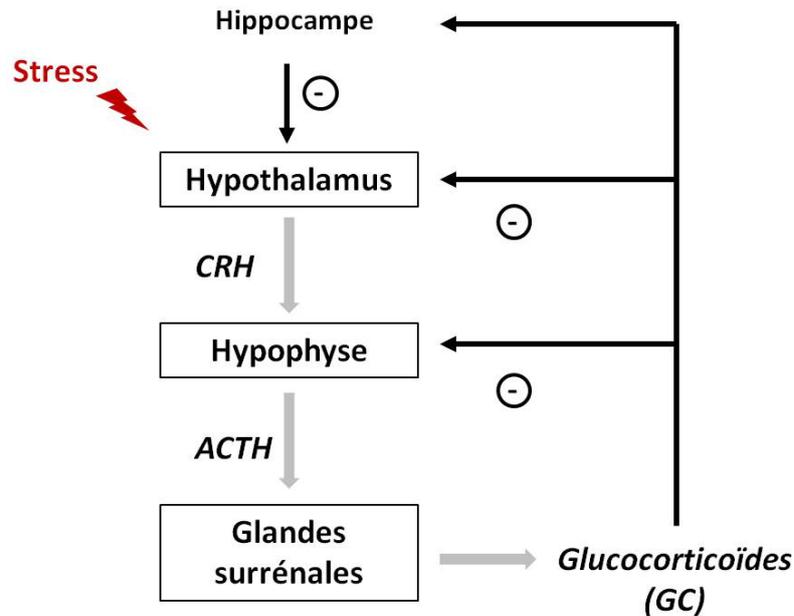


Figure 25 : Schéma simplifié du fonctionnement de l'axe HPA. L'exposition à un stress entraîne, entre autres, la libération du neuropeptide corticolibérine (CRH) depuis les neurones de la région parvocellulaire des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus. La CRH se lie à l'adénohypophyse, ce qui permet la libération de l'adrénocorticotropine (ACTH) dans la circulation générale. L'ACTH va alors agir au niveau des glandes surrénales et provoquer la libération de GC à partir des cellules de la zone corticale. Ces GC sont capables de réguler l'axe HPA par un mécanisme de rétrocontrôle négatif au niveau des différentes régions de l'axe mais également au niveau d'autres régions cérébrales incluant par exemple l'hippocampe. Ce rétrocontrôle négatif a pour but de protéger l'organisme d'un éventuel 'emballement' du système et de permettre le retour à l'activité basale.

Un niveau basal de GC est par ailleurs essentiel au bon fonctionnement du cerveau, comme la plasticité neuronale par exemple (pour revue : Krugers, 2011). Par contre, l'exposition à de fortes concentrations de GC induit des effets délétères sur les processus de plasticité synaptique et de mémorisation. Pavlides et collaborateurs ont par exemple observé que des niveaux élevés de corticostérone entraînent une altération de la LTP hippocampique (Pavlides et coll., 1993). De même, plusieurs études ont montré qu'un stress chronique induit des déficits mnésiques, notamment au niveau de la mémoire spatiale (Bodnoff et coll., 1995 ; Conrad et coll., 1996 ; Song et coll., 2006 ; Mizoguchi et coll., 2000). Ces altérations peuvent s'expliquer par le fait que ces niveaux élevés de GC pourraient induire des atteintes hippocampiques. En effet, de fortes concentrations en GC induisent d'une part une atrophie

de l'hippocampe et d'autre part une diminution de la neurogénèse (pour revue : McEwen, 1999).

Or, lors du vieillissement, on observe une diminution de l'efficacité de la régulation de l'axe HPA en réponse à un événement stressant (pour revue : Miller et O'Callaghan, 2005), qui pourrait être due, entre autres, à une diminution du nombre de récepteurs aux GC au niveau des différentes structures de l'axe HPA (Nichols et coll., 2001). Ceci limiterait donc le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA et exacerberait la libération de GC. On note en effet au cours du vieillissement un maintien de taux élevés de GC circulants suite à un événement stressant (Landfield et coll., 1978 ; Issa et coll., 1990 ; Morano et coll., 1994 ; Roozendaal, 2002). Compte tenu des effets délétères de fortes concentrations en GC sur l'hippocampe et les processus de plasticité synaptique et de mémorisation, les déficits mnésiques liés à l'âge pourraient de ce fait être sous-tendus, au moins en partie, par l'exacerbation de la réponse au stress observée lors du vieillissement (figure 26).

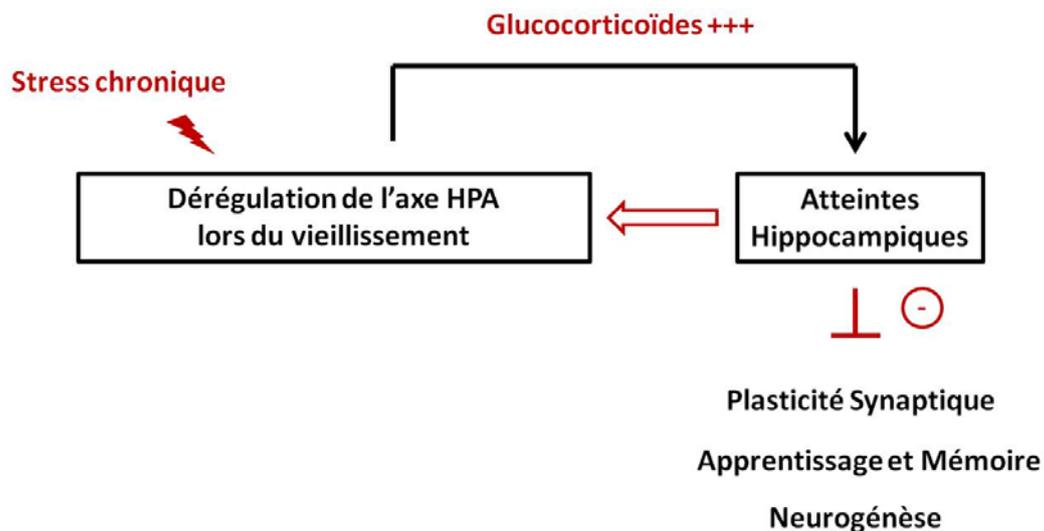


Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'hypothèse du rôle des GC dans la perte des fonctions hippocampiques liée au vieillissement. La réponse à un stress chronique est exacerbée avec l'âge, renforçant l'exposition de l'hippocampe aux fortes concentrations de GC circulants. Ceci entraîne l'altération des fonctions hippocampiques, comme l'apprentissage et la mémoire. Le renforcement de ces atteintes avec le vieillissement entraîne une dérégulation de plus-en-plus accrue de l'axe HPA, renforçant ainsi les niveaux de GC circulants.

II- Bases cellulaires du vieillissement

L'impact du vieillissement au niveau de la morphologie de l'encéphale ne semble pas jouer un rôle majeur dans le déclin cognitif observé lors du vieillissement normal. Chez le rongeur comme chez l'Homme, le vieillissement n'est pas caractérisé par une mort neuronale significative, que ce soit dans le néocortex ou dans l'hippocampe. On n'observe pas non plus de changements morphologiques majeurs au niveau des dendrites et des épines dendritiques (pour revue : Burke et Barnes ; 2006). Par ailleurs, la plupart des propriétés électriques des neurones semblent rester stables avec l'âge (pour revue : Barnes, 1994).

Par contre, plusieurs facteurs contribuant au 'bon fonctionnement' de l'encéphale sont perturbés au cours du vieillissement. On note en effet avec l'âge une perturbation de l'équilibre neurones/glies suite à l'apparition d'une gliose réactionnelle. On observe par ailleurs une dérégulation générale de certains systèmes de neurotransmission et une altération des processus de plasticité comme la LTP ou encore la neurogénèse. L'ensemble de ces modifications induirait donc une perturbation du fonctionnement de l'encéphale lors du vieillissement, ce qui pourrait expliquer le déclin cognitif, et notamment mnésique, lié à l'âge.

1. Vieillissement et gliose réactionnelle

Le vieillissement normal s'accompagne de changements morphologiques au niveau des cellules gliales, ce qui entraîne leur activation.

On distingue deux principaux types de cellules gliales : la macroglie, incluant les astrocytes et les oligodendrocytes, et la microglie. Les glies sont impliquées dans de nombreux processus incluant la constitution de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la nutrition neuronale, la régulation des neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique ou la maintenance de la neutralité électrique des cellules nerveuses (Kandel, 1991). Des études récentes ont par ailleurs mis en évidence une implication fonctionnelle des astrocytes dans les phénomènes de plasticité synaptique (Ben Menachem-Zidon et coll., 2011 ; Henneberger et coll., 2010 ; Haydon et Carmignoto, 2006 ; Volterra et Meldolesi, 2005 ; Newman, 2003).

Or, on observe lors du vieillissement une augmentation du nombre de cellules gliales, associée à de nombreux changements morphologiques au niveau de ces cellules. Cette gliose réactionnelle consiste à la fois en une hypertrophie des astrocytes (astrogliose) et en une augmentation des microglies actives. L'astrogliose est mise en évidence grâce à la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), une protéine qui constitue les filaments intermédiaires des astrocytes matures et qui est couramment utilisée en tant que marqueur du développement astrocytaire (Bjorklund et coll., 1985). On note en effet chez le Rongeur âgé une augmentation de taux d'ARNm et de protéines GFAP dans la plupart des régions cérébrales (O'Callaghan et Miller, 1991 ; Sheng et coll., 1996 ; Morgan et coll., 1997 ; Tramontina et coll., 2002). Cette augmentation de l'expression de la GFAP, qui témoigne donc de l'astrogliose induite au cours du vieillissement, est associée à des altérations des processus de plasticité synaptique (Finch, 2003 ; Nichols et coll., 2005) et à un renforcement des déficits cognitifs, notamment d'apprentissage spatial, chez le Rongeur âgé (Sugaya et coll., 1996 ; Soffié et coll., 1999).

Ces études montrent donc que la gliose réactionnelle, et plus particulièrement l'astrogliose, induite au cours du vieillissement, contribue aux déficits de plasticité synaptique et de mémoire observés chez le Rongeur âgé. Il est intéressant de souligner que l'expression de la GFAP est normalement régulée négativement par les GC chez le Rongeur (O'Callaghan et coll., 1991 ; Laping et coll., 1994). L'accumulation des GC lors du vieillissement, suite à l'altération de la réponse au stress chez les animaux âgés, pourrait de ce fait induire une perte de la sensibilité de la GFAP à ce rétrocontrôle négatif et favoriser ainsi l'astrogliose observée avec l'âge (Nichols et coll., 2001 ; Nichols et coll., 2005).

2. Vieillessement et neurotransmission : système cholinergique

Outre la perturbation des interactions neurones/glies suite à la gliose réactionnelle, on observe également au cours du vieillissement une dérégulation massive de certains systèmes de neurotransmission, dont le système cholinergique, qui est fortement impliqué dans les processus de mémorisation (pour revue : Hasselmo, 2006).

Au niveau anatomique, la principale source d'innervation cholinergique vers les différentes aires du système limbique et du néocortex provient des noyaux cholinergiques de

la base du cerveau antérieur (septum médian (SM), bande diagonale de Broca (BDB) et noyau basal magnocellulaire (NBM)) (figure 27).

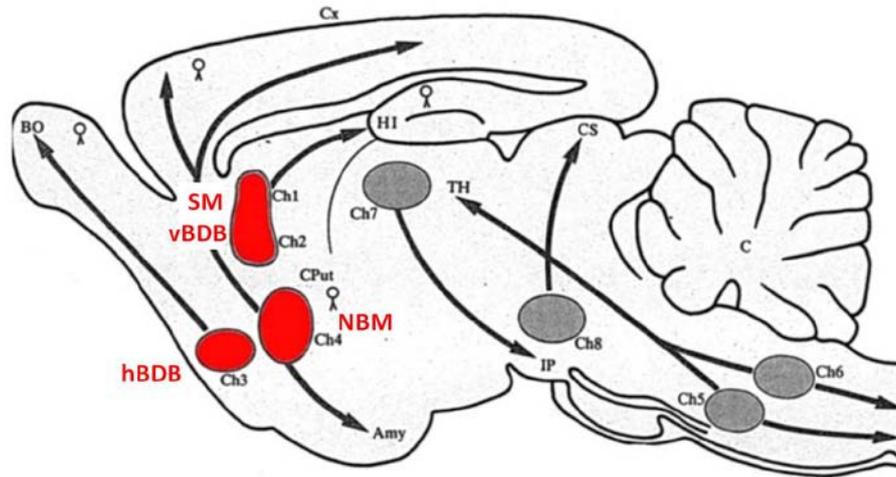


Figure 27 : Schéma indicatif de la localisation des noyaux cholinergiques de la base du cerveau antérieur chez le Rongeur (en rouge) ainsi que de leurs principales projections. SM : septum médian ; vBDB : bras vertical de la bande diagonale de Broca ; hBDB : bras horizontal de la bande diagonale de Broca ; NBM : noyau basal magnocellulaire (adaptée de 'Neuropeptides et Neuromédiateurs', Epelbaum J, Ed 1992).

Ces projections cholinergiques jouent un rôle important dans les fonctions cognitives comme l'apprentissage et la mémoire (Olton, 1990 ; Sarter et Bruno, 1997 ; Ridley et coll., 1999 ; Traissard et coll., 2007). En effet, des lésions sélectives des neurones cholinergiques de ces structures de la base du cerveau antérieur (lésions réalisées avec l'immunotoxine IgG-saporine) induisent, chez le Rongeur, une diminution des capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale dans différentes tâches, comme le MWM par exemple (Traissard et coll., 2007 ; Moreau et coll., 2008).

Or, ce système de neurotransmission est particulièrement vulnérable au processus de vieillissement. En effet, on observe chez le Rongeur, au cours du vieillissement, une diminution de la synthèse de l'acétylcholine (ACh) (Dravid, 1993), de sa libération (Sastry et coll., 1983) et une diminution de l'activité choline acétyltransférase (enzyme de synthèse de l'ACh) (Albeck et coll., 1999), associées à une dégénérescence modérée des neurones cholinergiques, notamment au niveau des régions de la base du cerveau antérieur (pour revue : Schliebs et Arendt, 2011).

Compte tenu de son implication dans les processus mnésiques et de sa vulnérabilité au processus de vieillissement normal, mais aussi pathologique comme la MA, le système cholinergique a été abondamment étudié ces 30 dernières années. En effet, les déficits cholinergiques liés à l'âge ont longtemps été considérés comme un facteur majeur du déclin cognitif, et en particulier mnésique, observé au cours du vieillissement (pour revue : Bartus et coll., 1982). Néanmoins, beaucoup de neurones cholinergiques sont encore présents et fonctionnels au niveau des noyaux de la base du cerveau antérieur. De plus, les traitements pharmacologiques basés sur des cholinomimétiques (inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme de dégradation de l'ACh) n'ont que des effets bénéfiques limités sur les capacités mnésiques (pour revue : Martorana et coll., 2010). Par conséquent, ceci suggère que le système cholinergique n'est pas le seul système de neurotransmission impliqué dans le déclin mnésique lié à l'âge. D'autres systèmes de neurotransmission également mis en jeu dans les processus cognitifs, et notamment mnésiques, doivent certainement être altérés au cours du vieillissement et participer, avec le système cholinergique, à l'apparition des déficits cognitifs observés lors du vieillissement.

Par exemple, le système de neurotransmission glutamatergique, impliqué dans la plupart des synapses excitatrices du SNC, est également altéré au cours du vieillissement. Cette perturbation est par ailleurs corrélée à des déficits mnésiques (pour revues : Rosenzweig et Barnes, 2003 ; Foster, 1999). Dans l'hippocampe, cette altération du système glutamatergique s'effectue de manière région-spécifique et est associée à un dysfonctionnement au niveau des synapses (pour revue : Billard, 2006), contribuant par exemple à des changements de seuil d'induction de la LTP hippocampique observés avec l'âge (Barnes et coll., 2000).

En plus de la modification du ratio neurones/glies et de la dérégulation de certains systèmes de neurotransmission au cours du vieillissement, on observe, plus particulièrement au niveau de l'hippocampe, une altération des processus de plasticité hippocampique, comme la LTP par exemple, qui pourrait également contribuer aux déficits mnésiques liés à l'âge (pour revue : Burke et Barnes, 2006). Une perturbation de la neurogénèse adulte pourrait, elle aussi, participer à ce déclin des fonctions cognitives, observé lors du vieillissement.

3. Vieillesse et plasticité synaptique

Une partie des déficits observés au niveau des processus de plasticité synaptique a pu être évaluée en mesurant la LTP au niveau des synapses de neurones hippocampiques issus de rongeurs âgés.

Les animaux âgés présentent des déficits aussi bien au niveau de la phase d'induction que de la phase de maintenance de la LTP. Néanmoins, ces déficits sont complexes et dépendent des protocoles expérimentaux utilisés ainsi que de la région hippocampique étudiée (pour revue : Burke et Barnes, 2010). En effet, dans un protocole classique de stimulation (haute intensité), on observe chez les rats âgés des déficits uniquement au niveau de la phase de maintenance de la LTP, dans le gyrus denté (Barnes, 1979), mais pas dans CA1 (Landfield et Lynch, 1977 ; Landfield et coll., 1978). Par contre, si l'on pratique des stimulations d'intensité plus faible, des déficits d'induction de la LTP sont alors observables chez les rats âgés, dans le gyrus denté (Diana et coll., 1994 ; Sierra-Mercado et coll., 2008) et dans CA1 (pour revue : Burke et Barnes, 2006) (figure 28).

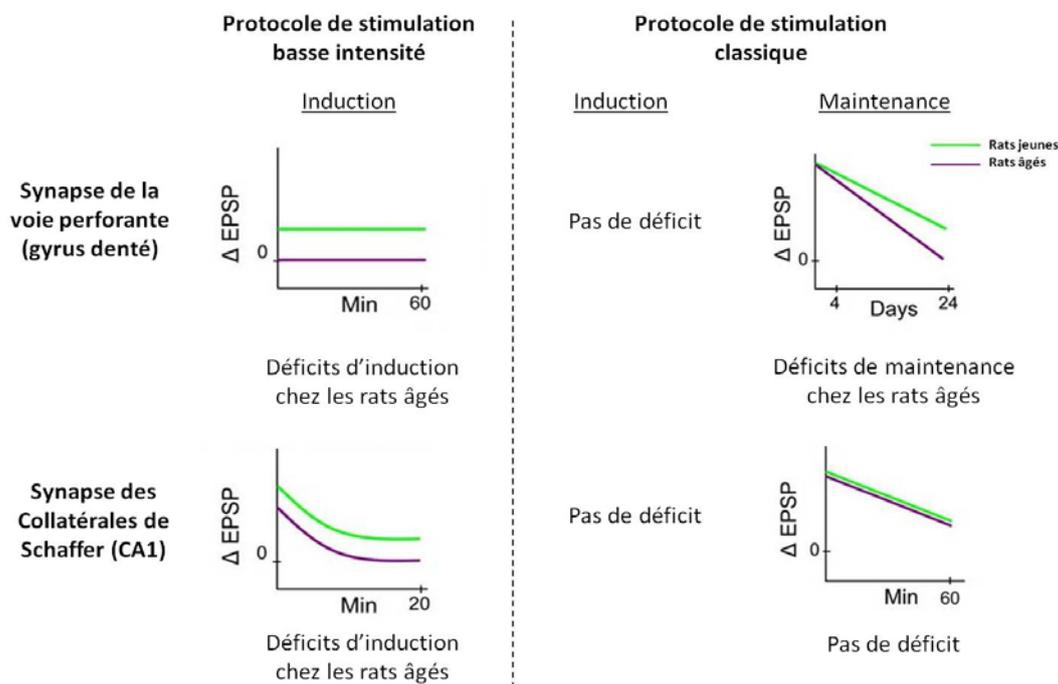


Figure 28 : Bilan des altérations de la LTP observées chez le Rat âgé au niveau des synapses du gyrus denté et de CA1. Les graphiques représentent les changements d'amplitude des PPSE (mV) au cours du temps en réponse aux différents types de stimulations (haute et basse intensité) lors des processus d'induction ainsi que de maintenance de la LTP (adaptée de Burke et Barnes, 2010).

Il est par ailleurs intéressant de préciser que de nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de la conductance Ca^{2+} dans les neurones de rongeurs âgés. En effet, on note, dans les neurones de CA1, une augmentation de la densité en canaux calciques de type-L qui participe à la perturbation de l'homéostasie calcique observée lors du vieillissement normal (Thibault et Landfield, 1996). Cette dérégulation calcique affecte de nombreuses voies de signalisation et par conséquent influence les fonctions physiologiques, cellulaires et moléculaires des neurones (pour revue : Toescu et coll., 2004). Or, plusieurs études ont montré que les niveaux calciques intracellulaires post-synaptiques déterminent le seuil d'induction de la LTP (Foster et Norris, 1997 ; Bear et Malenka, 1994). Il est donc possible que la perturbation de l'homéostasie calcique qui apparaît avec l'âge contribue aux altérations de plasticité synaptique, et notamment de LTP, observées au cours du vieillissement au niveau des neurones hippocampiques (pour revue : Burke et Barnes, 2006).

Enfin, il est important de noter que différentes études ont mis en évidence une corrélation entre déficits de LTP et déficits mnésiques, qui apparaissent tous deux au cours du vieillissement. Les premières études réalisées par Barnes en 1979 montrent, chez le rat âgé, une corrélation entre un retard dans l'apprentissage d'une tâche spatiale (labyrinthe de Barnes) et la durée du renforcement synaptique dans le gyrus denté (Barnes, 1979). D'autres travaux ont établi une corrélation entre les déficits d'apprentissage (retard) d'une tâche spatiale et les déficits observés aussi bien au niveau de l'induction que de la maintenance de la LTP, les deux phases présentant un retard d'apparition chez les animaux âgés par rapport aux animaux jeunes (Bach et coll., 1999 ; de Toledo-Morrell et Morrell, 1985). Dans l'ensemble, ces données indiquent donc que les déficits mnésiques observés chez le Rongeur âgé sont à mettre en parallèle avec les déficits d'induction et/ou de maintenance de la LTP, qui apparaissent au cours du vieillissement (pour revues : Rosenzweig et Barnes, 2003 ; Lynch et coll., 2006).

4. Vieillissement et neurogénèse hippocampique

La LTP n'est pas le seul mécanisme cellulaire à être altéré au cours du vieillissement. Une perturbation de la neurogénèse apparaît également avec l'âge et pourrait de ce fait contribuer aux déficits cognitifs observés chez le Rat âgé.

La neurog nese est le processus par lequel de nouveaux neurones fonctionnels sont générés à partir de précurseurs neuronaux. Cette neurog nese a tout d'abord été identifiée chez les mammifères au cours du développement embryonnaire et de la période périnatale (Angevine, 1965 ; Schlessinger et coll., 1975). Les études d'Altman et Das ont été les premières à mettre en évidence des cellules granulaires nouvellement formées au niveau du gyrus denté de l'hippocampe, chez le Rat adulte (Altman et Das, 1965). Cette neurog nese active, observée chez l'adulte, a lieu dans deux régions spécifiques de l'encéphale, appelées niches neurogéniques : la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux. Les neurones nouvellement formés sont ensuite intégrés dans la circuiterie neuronale existante et ils contribuent ainsi aux fonctions cérébrales aussi bien en conditions normales que pathologiques (dépression, maladies neurodégénératives, etc...) (pour revue : Zaho et coll., 2008) (figure 29).

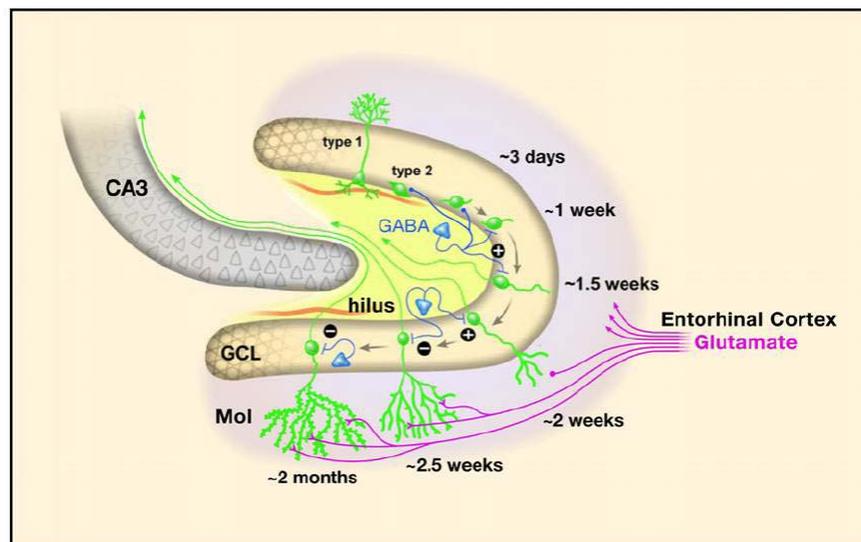


Figure 29 : Neurog nese hippocampique. Dans la SGZ du gyrus denté, la prolifération des précurseurs radiaux (cellules de type 1) et non radiaux (cellules de type 2) donne naissance aux progéniteurs neuronaux, qui génèrent, à leur tour, les neuroblastes. Les neurones immatures migrent alors au niveau de la couche granulaire (GCL) et se différencient en cellules granulaires. Après quelques jours (10-15 jours), ces neurones présentent des extensions dendritiques au niveau de la couche moléculaire (Mol), et leurs axones projettent au niveau de l'aire CA3. En parallèle, ils subissent un processus d'intégration au niveau des circuits neuronaux existants. D'abord activés de manière tonique par les libérations GABAergiques ambiantes provenant des interneurons locaux, les neurones se retrouvent dans un état de dépolarisation. Au cours de la période critique d'intégration, à l'âge de 1-3 semaines, ces neurones passent par un stade d'hyperpolarisation en réponse aux afférences synaptiques inhibitrices de GABA, et finalement par un stade dépolarisant en réponse aux stimulations synaptiques glutamatergiques en provenance du cortex entorhinal (2-4 sem) (adaptée de Zaho et coll., 2008).

La neurogenèse adulte peut être influencée par un grand nombre de facteurs aussi bien intrinsèques, comme l'activité neuronale, les hormones et les facteurs de croissance, qu'extrinsèques, comme l'environnement enrichi, l'activité physique et le stress par exemple (Overstreet-Wadiche et Westbrook, 2006). L'activité physique, tout comme l'apprentissage par exemple stimulent la neurogenèse, alors que le stress, au contraire, va plutôt la réprimer (pour revues : Abrous et coll., 2005 ; Ming et Song, 2005).

Bien qu'un certain nombre de travaux se contredisent à ce sujet, de nombreuses études ont établi une corrélation entre la neurogenèse hippocampique et les processus d'apprentissage et de mémoire dépendants de l'hippocampe (Gould et coll., 1999 ; pour revues : Deng et coll., 2010 ; Zhao et coll., 2008 ; Bruel-Jungerman et coll., 2007). En effet, les neurones nouvellement formés sont fonctionnellement incorporés dans la circuiterie hippocampique existante. Des études récentes ont démontré qu'ils participent ainsi aux processus de mémoire spatiale récente (Arruda-Carvalho et coll., 2011 ; Stone et coll., 2011 ; Goodman et coll., 2010 ; Kee et coll., 2007). Par exemple, Frankland et collaborateurs ont mis en évidence un recrutement préférentiel des neurones nouvellement formés (à un stade précis de leur maturation) dans les circuits impliqués dans la mémoire spatiale (Kee et coll., 2007). Ces 'nouveaux' neurones participent également au rappel de la mémoire spatiale ancienne. Par exemple, une étude de Rampon et collaborateurs a mis en évidence une activation des neurones nouvellement formés (expression de *zif268*) lors d'un test de rétention effectué 30 jours après un apprentissage en MWM, ce qui témoigne de leur incorporation fonctionnelle dans la circuiterie neuronale sous-tendant la mémoire ancienne (Trouche et coll., 2009). Il est par ailleurs important de préciser qu'on observe une régulation très précise de la neurogenèse tout au long d'un apprentissage en MWM. En effet, cet apprentissage va entraîner la survie des neurones nés une semaine avant le début de l'apprentissage, et en même temps, induire l'apoptose de ceux nés 3 jours avant. Ces résultats suggèrent donc que l'apprentissage spatial est capable de réguler les neurones nouvellement formés, selon leur niveau de maturation et leur intérêt fonctionnel (Dupret et coll., 2007).

La neurogénèse hippocampique persiste avec l'âge chez le Rongeur (pour revue : Verret et coll., 2007). Cependant, on note une diminution du nombre de neurones nouvellement formés, et ce déjà à partir d'un âge moyen (12 mois) (Kuhn et coll., 1996 ; Hattiangady et coll., 2005). Cette diminution du nombre de neurones nouvellement formés peut s'expliquer soit par une diminution du nombre de précurseurs neuronaux, soit par une réduction de leur prolifération, soit par une diminution de la survie et de la différenciation des neurones nouvellement formés. Aucun changement du nombre de précurseurs n'a été observé dans la SGZ lors du vieillissement chez le Rat (Hattiangady et coll., 2008). La survie des neurones nouvellement formés ne semble pas non plus affectée (Rao M et coll., 2005 ; McDonald et Wojtowicz, 2005). Par contre, plusieurs travaux s'accordent à montrer dans le gyrus denté une diminution progressive de la prolifération des précurseurs neuronaux avec l'âge (Kuhn et coll., 1996 ; Kempermann et coll., 1998 ; Lemaire et coll., 2000 ; Bondolfi et coll., 2004 ; Cuppini, 2006).

Le vieillissement s'accompagne donc d'une réduction de la neurogénèse, due à une diminution progressive de la prolifération des précurseurs neuronaux avec l'âge. Il est cependant possible, lors du vieillissement, d'améliorer cette prolifération en augmentant les facteurs pro-neurogéniques (Lichtenwalner R et coll., 2001 ; Jin K et coll., 2003). En effet, une administration intra-cérébroventriculaire du facteur de croissance IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) entraîne une augmentation marquée du nombre de neurones nouvellement formés dans l'hippocampe de rats âgés de 28 mois (Lichtenwalner et coll., 2001). Ceci suggère donc que la diminution de la prolifération des précurseurs neuronaux observée avec l'âge est liée à des changements au niveau de la niche neurogénique, qui pourrait alors être appauvrie en stimulations prolifératives. Nous avons par ailleurs vu que la neurogénèse adulte peut également être influencée par des facteurs extrinsèques comme le stress. Or la réponse au stress est perturbée lors du vieillissement (voir partie Vieillessement et mémoire chez le Rongeur, page 70 du manuscrit). En effet, on observe chez les animaux âgés une dérégulation de l'axe HPA, ce qui aboutit à une suractivation de celui-ci en réponse à un stress et donc à un taux particulièrement élevé de GC dans l'encéphale. Ceci est corrélé chez les animaux âgés à une diminution de la neurogénèse hippocampique ainsi qu'à des déficits de mémoire spatiale (pour revue : Drapeau et Abrous, 2008 ; Klempin et Kempermann, 2007). L'effet néfaste de concentrations trop importantes de GC sur la neurogénèse est également appuyé par les travaux de Montaron et collaborateurs, qui montrent qu'une adrénalectomie effectuée à un âge moyen chez le Rat (abolissant ainsi la libération de GC) empêche l'apparition des déficits de

neurogénèse et de mémoire spatiale normalement observés chez le Rat âgé (Montaron et coll., 2006). L'ensemble de ces données indique donc, d'une part, que la diminution des facteurs pro-neurogéniques ainsi que l'exposition à de fortes concentrations de GC en réponse à un stress contribuent à la diminution de la neurogénèse au cours du vieillissement, et d'autre part, que cette diminution de la neurogénèse avec l'âge pourrait participer aux déficits de mémoire spatiale observés chez le Rat âgé. Il est intéressant de noter que la régulation fine de la neurogénèse observée au cours d'un apprentissage spatial en MWM chez le Rat jeune adulte (Dupret et coll., 2007) est maintenue chez les rats âgés caractérisés par de bonnes aptitudes mnésiques, alors qu'elle est perdue chez les rats âgés présentant des déficits d'apprentissage dans le MWM (Drapeau et coll., 2003 ; 2007). La perte de cette régulation fine de la neurogénèse au cours du vieillissement pourrait donc également contribuer aux déficits mnésiques observés avec l'âge.

Compte tenu de l'implication de la neurogénèse dans la mémoire spatiale, la baisse des capacités neurogéniques associée à une perte de la régulation fine de la neurogénèse chez l'animal âgé pourrait limiter la capacité de l'hippocampe à acquérir et/ou stocker de nouveaux souvenirs et participer ainsi au déclin cognitif observé au cours du vieillissement.

III- Bases moléculaires du vieillissement

1. Impact du vieillissement sur la transcription de gènes

Comme nous venons de le voir, différents processus, comme la LTP et la consolidation de la mémoire, mais aussi la neurogénèse ou encore la réponse au stress, sont altérés au cours du vieillissement. Or ces processus nécessitent tous la transcription de gènes et la synthèse protéique *de novo*. Par conséquent, il n'est pas étonnant de noter l'apparition avec l'âge d'un certain nombre de changements aberrants au niveau de la transcription de gènes, et ce notamment dans l'hippocampe. Des expériences de micropuces à ADN (*microarrays*) ont permis de mettre en évidence ces changements au niveau de nombreux gènes impliqués dans divers processus physiologiques, comme la plasticité synaptique par exemple (Blalock et coll., 2003 ; Rowe et coll., 2007 ; Burger et coll., 2008 ; Zeier et coll., 2011).

Les processus de plasticité qui interviennent dans la formation de la mémoire nécessitent, entre autres, la transcription de certains gènes précoces (*immediate-early genes* (IEGs)), comme les gènes *Arc*, *zif268* (ou *EgR1*), ou encore le *bdnf* (Guzowski et coll., 2000 ; Hall et coll., 2000 ; Jones et coll., 2001 ; Steward et Worley, 2001). L'expression de certains de ces gènes diminue dans l'hippocampe lors du processus de vieillissement normal, ce qui pourrait contribuer à la détérioration des capacités d'apprentissage et de mémorisation, en particulier au niveau de la mémoire spatiale (Blalock et coll., 2003 ; Small et coll., 2004 ; Rowe et coll., 2007).

Compte tenu de son importance dans la LTP et la formation de la mémoire à long terme, le gène *Arc* semble être un bon candidat pour l'étude des mécanismes sous-tendant le déclin cognitif lié à l'âge (Guzowski et coll., 2000). Il est intéressant de noter que les différentes sous-régions de l'hippocampe sont affectées de manière différentielle lors du vieillissement, en fonction des conditions expérimentales. En effet, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que l'expression de *Arc* est diminuée dans les neurones granulaires du gyrus denté suite à une exploration spatiale chez le Rat âgé (Small et coll., 2004 ; Penner et coll., 2011), alors qu'en conditions basales, on observe une réduction

préférentielle de sa transcription au niveau des neurones pyramidaux de CA1 (Penner et coll., 2011).

Le système du *bdnf* est, lui aussi, influencé par le vieillissement. En effet, les niveaux de BDNF et de son récepteur TrkB ne sont pas constants avec l'âge et varient en fonction de la souche de Rat ainsi que de la sous-région hippocampique étudiée (pour revue : Tapiarancia et coll., 2008). Par exemple, des travaux récents indiquent une forte diminution en conditions basales de la transcription du *bdnf* avec l'âge au niveau de CA1 et CA3 (Chapman et coll., 2011). Plusieurs études ont établi un lien, au cours du vieillissement, entre cette diminution des niveaux de *bdnf* et les déficits de plasticité. La diminution de la protéine du BDNF dans l'hippocampe, lors du vieillissement, est par exemple corrélée à une perturbation de la LTP ainsi qu'à plusieurs modifications au niveau des voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique (Zeng et coll., 2011). D'autres études ont également corrélé cette diminution protéique du BDNF à la baisse de neurogénèse observée avec l'âge (Hattiangady et coll., 2005). Ce lien entre diminution du *bdnf* et déficits de plasticité au cours du vieillissement est par ailleurs renforcé par les travaux de Diogenes et collaborateurs et ceux de Zeng et collaborateurs, qui montrent que l'activation de la voie du *bdnf* induit une amélioration des phénomènes de plasticité chez le Rat âgé, comme une augmentation de la LTP par exemple (Diogenes et coll., 2011 ; Zeng et coll., 2011). D'autres études se sont plutôt intéressées à la régulation de la transcription du *bdnf* au cours du vieillissement, en réponse à un apprentissage, et ont montré, dans l'hippocampe de rats âgés, une perte de l'augmentation de la transcription du *bdnf* induite normalement en réponse au CFC (Chapman et coll., 2011). Il est intéressant de noter que Schaaf et collaborateurs ont établi, chez les rats âgés, un lien entre niveaux de performances mnésiques et taux de *bdnf* dans l'aire CA1 de l'hippocampe. En effet, la transcription du *bdnf* est induite en réponse à un apprentissage spatial en MWM (3h après l'apprentissage) chez les rats âgés caractérisés par de bonnes capacités mnésiques, alors que cette induction est perdue dans le groupe de rats présentant des déficits (Schaaf et coll., 2001).

L'exemple de ces deux gènes montre donc qu'une mauvaise régulation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, au cours du vieillissement, participe aux déficits de plasticité synaptique et de mémoire observés chez le Rongeur âgé.

Cette perturbation de la transcription de gènes au cours du vieillissement peut s'expliquer par des modifications de l'activité de certains facteurs de transcription avec l'âge. Certaines études ont par exemple mis en évidence une diminution progressive de la phosphorylation du facteur de transcription CREB, et donc de son activité, dans l'hippocampe de Rat âgé (Hattiangady et coll., 2005 ; Kudo et coll., 2005), et dans celui de Souris âgée (Porte et coll., 2008). Cette réduction de l'activité de CREB lors du vieillissement a été corrélée à des déficits d'apprentissage et de mémoire dans des tâches dépendantes de l'hippocampe (Porte et coll., 2008 ; Kudo et coll., 2005), mais également à des déficits de neurogénèse (Hattiangady et coll., 2005). En effet, plusieurs études ont montré l'importance du facteur de transcription CREB dans la régulation des différents stades du processus de neurogénèse (pour revue : Merz et coll., 2011). Sa forme active (P-CREB) est d'ailleurs présente dans la majorité des neurones immatures nouvellement formés de l'hippocampe (Jagasia et coll., 2009).

2. Hypothèse épigénétique des atteintes mnésiques liées à l'âge

Comme nous l'avons vu précédemment, la méthylation de l'ADN ainsi que l'acétylation des histones semblent fonctionner de paire pour permettre la régulation des phénomènes de plasticité synaptique et de formation de la mémoire dans l'encéphale adulte, *via* la régulation de la transcription de gènes impliqués dans ces processus.

Une idée émergente est que la structure de la chromatine est dynamique et sujette à des remodelages associés à l'âge (pour revue : Feser et Tyler, 2011). La méthylation de l'ADN dans le cerveau humain, par exemple, est altérée au cours du vieillissement. Au départ, les études menées dans le domaine de la cancérologie ont mis en évidence une perte globale de la méthylation de l'ADN avec l'âge, associée à l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes jouant un rôle de suppresseur de tumeurs (pour revue : Fraga et Esteller, 2007). On observe également des changements au niveau de la méthylation de l'ADN dans l'encéphale, qui se répercutent sur la régulation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de vieillissement normal et pathologique. On note par exemple une hyperméthylation plus prononcée au niveau de certaines portions du génome dans le cortex de

patients Alzheimer par rapport aux sujets âgés sains, ce qui pourrait contribuer à l'accélération des altérations observées au niveau moléculaire lors du vieillissement normal (Siegmund et coll., 2007). Au vu des changements observés au niveau de la méthylation de l'ADN avec l'âge, il est possible que ceux-ci contribuent aux déficits cognitifs observés lors du vieillissement. Une étude récente a d'ailleurs montré des changements de méthylation de l'ADN au niveau du gène *Arc* dans l'hippocampe de Rat âgé. Or ce gène est impliqué dans les processus de plasticité et de mémoire. Par conséquent, ces changements, associés à la perturbation de la régulation de l'expression du gène *Arc*, pourraient contribuer aux déficits de mémoire spatiale observés lors du vieillissement (Penner et coll., 2011).

La méthylation de l'ADN n'est pas la seule modification épigénétique altérée au cours du vieillissement. Fischer et collaborateurs se sont intéressés à l'effet de l'âge sur l'acétylation des histones (Peleg et coll., 2010). Ils ont étudié l'acétylation des histones chez la Souris âgée de 16 mois. En effet, à cet âge, on observe l'apparition des premiers déficits de mémoire spatiale dans le test du MWM. En conditions basales (Home Cage), ces souris âgées présentent des niveaux d'activité HAT et HDAC similaires à ceux des souris contrôles âgées de 3 mois. En accord avec ce résultat, les niveaux d'acétylation des histones et les profils d'expression des gènes étudiés ne varient pas significativement entre les deux groupes en conditions basales. Par contre, suite à un CFC, on observe un déficit au niveau de l'induction de l'acétylation de H4K12 chez les souris âgées par rapport aux contrôles jeunes, alors que toutes les autres acétylations d'histones semblent toujours inductibles. Des séquençages post-immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-*seq*) montrent que ce défaut d'acétylation globale de H4K12 observé chez les souris âgées contribue à une diminution de l'expression d'un nombre considérable de gènes dont la transcription est normalement induite en réponse à l'apprentissage. Il est par ailleurs intéressant de souligner que l'administration d'un HDACi, capable d'induire l'acétylation de H4K12, permet le maintien des capacités mnésiques normalement perdues avec l'âge. Ces données montrent donc que la dérégulation de l'acétylation de H4K12 avec l'âge participe aux déficits mnésiques qui apparaissent lors du vieillissement. De manière plus générale, cette modification semble témoigner de la dérégulation des interactions entre le génome et l'environnement dans le cerveau âgé.

Une seconde étude plus récente, chez le Rat âgé (22-23 mois), a mis en évidence une atteinte plus marquée des mécanismes d'acétylation des histones lors du vieillissement (Zeng et coll., 2011). Ces changements, détectés dans l'hippocampe en conditions basales,

participent à la réduction progressive de l'expression du *bdnf* avec l'âge. En effet, on note une baisse des acétylations des histones H3 et H4 sur différents promoteurs de ce gène. Ces altérations induisent un remodelage de la structure de la chromatine au niveau du gène, ce qui réprime sa transcription, et sont associées à une perturbation des voies de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique et à un déficit de LTP dans l'hippocampe. De manière intéressante, l'administration de HDACi mais également l'activation des récepteurs TrkB permettent de restaurer ces déficits de plasticité synaptique en stimulant la transcription et la synthèse du *bdnf*.

Les résultats obtenus dans ces deux études mettent donc en évidence, d'une part, l'apparition avec l'âge de perturbations au niveau des mécanismes d'acétylation des histones, et montrent d'autre part que ces altérations des mécanismes épigénétiques participent aux déficits de plasticité et de mémoire observés lors du vieillissement (figure 30). Cependant, le degré de sévérité des altérations épigénétiques diffère entre les deux études, ce qui suggère que celui-ci dépend de l'âge, de l'espèce, et certainement de la souche étudiée.

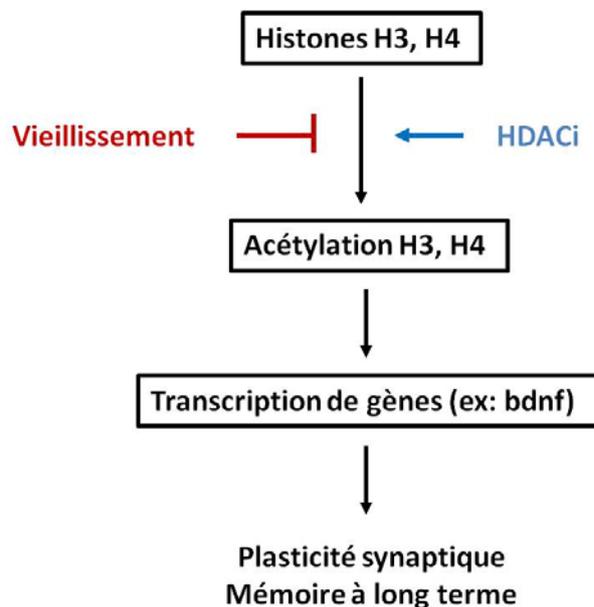


Figure 30 : Schéma simplifié de l'implication de l'acétylation des histones dans les déficits de plasticité synaptique et de mémoire liés à l'âge chez le Rongeur.

Ainsi, ces différentes études suggèrent que la dérégulation des mécanismes épigénétiques ainsi que l'accumulation de marques aberrantes au cours du vieillissement sous-tendent, en partie, certains déficits cognitifs liés à l'âge. Ces altérations entraînent en effet une diminution de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, comme *Arc* et le *bdnf* par exemple, dans des régions particulièrement vulnérables lors du processus de vieillissement comme l'hippocampe.

Bien que de nombreux traitements pharmacologiques aient été développés dans des modèles de vieillissement chez le Rongeur, dans le but de réduire ou d'empêcher l'apparition des déficits mnésiques liés à l'âge, plusieurs études suggèrent qu'un simple traitement comportemental, l'environnement enrichi, est capable d'améliorer les capacités cognitives (pour revue : Nithianantharajah et Hannan, 2009). En effet, il a par exemple été montré qu'une stimulation intellectuelle soutenue, tout au long de la vie de l'individu, favorise le maintien des capacités cognitives chez l'Homme (pour revue : Valenzuela, 2008). Compte tenu du maintien de la plasticité cérébrale jusqu'à un âge avancé chez le Rongeur (Rosenzweig et Benneth, 1996 ; Rosenzweig, 1996), il paraît donc possible de contrer cette perte des capacités cognitives observée au cours du vieillissement *via* une combinaison de différentes stimulations sensorielles, motrices et cognitives.

CHAPITRE 4

ENVIRONNEMENT ENRICHI

ET

MEMOIRE

CHAPITRE 4

ENVIRONNEMENT ENRICHIS ET MEMOIRE

Avec l'augmentation de l'espérance de vie et, par conséquent, du pourcentage de personnes âgées au sein de la population humaine, le développement de traitements pharmacologiques permettant un ralentissement du déclin cognitif lié à l'âge constitue un axe de recherche prioritaire dans le domaine des Neurosciences. Cependant, un nombre croissant d'études met en évidence qu'une simple combinaison de stimulations environnementales, à savoir des stimulations cognitives, sociales ou encore physiques, semblent ralentir l'apparition et le développement d'un certain nombre de troubles cognitifs liés à l'âge.

Des études épidémiologiques montrent que ces stimulations sont capables de réduire les déficits cognitifs qui apparaissent aussi bien lors du vieillissement normal que pathologique. En effet, un mode de vie 'riche en stimulations' (type de profession, stimulations sociales, niveau d'éducation élevé, loisirs) est fortement corrélé à une diminution des atteintes cognitives liées à l'âge, et notamment des atteintes mnésiques, ainsi qu'à une réduction du risque de développer une maladie d'Alzheimer (Daffner, 2010 ; Fratiglioni et Qiu, 2009 ; Shimamura et coll., 1995 ; pour revue : Valenzuela, 2008). De manière intéressante, il a été montré que même des stimulations cognitives qui débutent tardivement dans la vie de l'individu sont toujours bénéfiques et réduisent notamment le risque de démence (Plassman et coll., 2010 ; Verghese et coll., 2003 ; Wilson et coll., 2002).

Compte tenu de l'impact de ces stimulations sur les déficits cognitifs liés à l'âge chez l'Homme, il est important de comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces effets. C'est pourquoi cette combinaison de stimulations a été modélisée chez le Rongeur, grâce à l'utilisation de conditions d'élevage en 'environnement enrichi'(EE).

I- Notion d'environnement enrichi

Le contexte expérimental d'EE a été introduit pour la première fois à la fin des années 1940 par Donald Hebb. Celui-ci voulait étudier les effets, sur le comportement et la cognition du Rat, d'une exposition à un environnement plus complexe. Ses premières observations ont été faites sur des rats qu'il a autorisés à se déplacer librement (*'free environment'*) à son domicile. Il s'est alors rendu compte que leurs capacités cognitives étaient supérieures à celles des rats laissés dans les cages du laboratoire. En effet, les rats qu'il avait ramenés chez lui présentaient de meilleures capacités d'apprentissage d'une tâche de labyrinthe en comparaison aux rats laissés au laboratoire (Hebb, 1949). Hebb a ainsi été le premier à montrer qu'une simple exposition à un environnement 'enrichi' pouvait induire une amélioration des capacités cognitives. Bien qu'à l'époque, ces conditions d'enrichissement '*at home*' manquaient certainement de contrôles rigoureux et adaptés, celles-ci présentaient néanmoins des caractéristiques essentielles à tout EE, comme la 'nouveauité' et la 'complexité'. Depuis, de nombreux travaux se sont intéressés aux effets bénéfiques de l'EE, notamment sur les capacités cognitives de l'animal, et cherchent à comprendre les mécanismes qui les sous-tendent (pour revue : Nithianantharajah et Hannan, 2006).

La notion d'EE en laboratoire fait donc référence aux conditions de stabulation des animaux. Un environnement dit 'enrichi' s'oppose à des conditions d'élevage standard, dans lesquelles l'utilisation des habiletés et les comportements naturels de l'animal sont limités. En général, les animaux 'enrichis' sont élevés dans de plus grandes cages, avec un nombre plus important de congénères, ce qui favorise les interactions sociales. De plus, l'environnement des animaux est régulièrement modifié durant la période expérimentale. En effet, les différents objets placés dans la cage (tunnels, jouets) sont fréquemment changés et/ou déplacés, ce qui confère à l'environnement des animaux les critères de 'nouveauité' et de 'complexité', deux composantes essentielles de tout EE. Les animaux 'enrichis' sont donc exposés à la fois à des stimulations sociales, à des stimulations cognitives, qui impliquent la formation de cartes spatiales, et à de nombreuses stimulations sensorielles (visuelles, olfactives et somatosensorielles). Par ailleurs, ces conditions d'élevage favorisent également les mouvements naturels d'exploration et augmentent de ce fait l'activité motrice. Certains

protocoles permettent même aux animaux de pratiquer une activité physique volontaire grâce à l'utilisation de roues (*running wheel*).

L'EE peut donc être défini comme la 'combinaison de stimulations sociales et inanimées', qui favorise une augmentation à la fois des stimulations sensorielles, motrices et cognitives (Rosenzweig et coll., 1978) (figure 31).

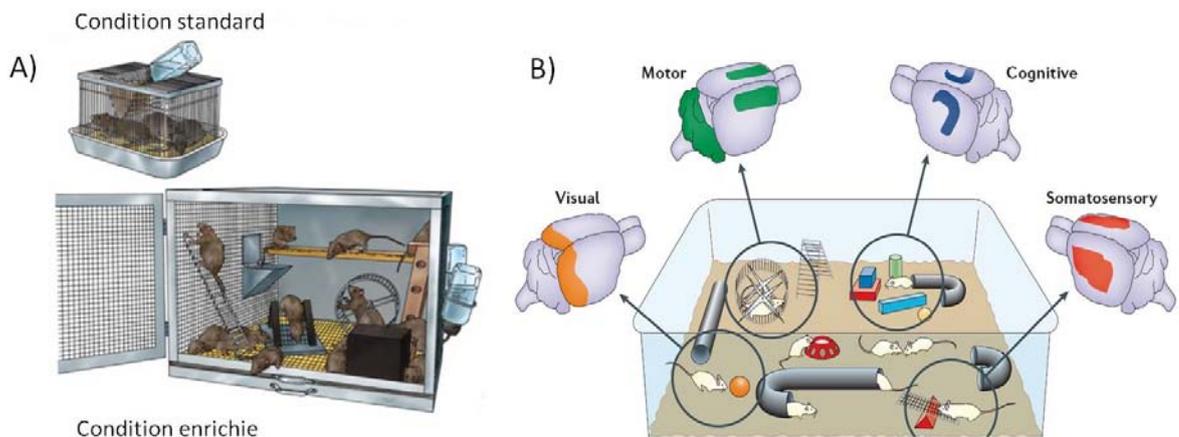


Figure 31 : Représentation des conditions d'EE. A) Dessins représentant les conditions d'élevage en EE en comparaison aux conditions standard d'élevage. B) Un EE augmente les stimulations sensorielles, motrices et cognitives dans différentes structures de l'encéphale (Adaptée de Nithianantharajah et Hannan, 2006). L'EE stimule l'activité neuronale et la plasticité au niveau de différentes régions cérébrales. Les stimulations sensorielles activent les aires somato-sensorielles (rouge) et visuelles (orange). Les stimulations cognitives activent l'hippocampe (bleu) et d'autres aires corticales. Enfin, l'augmentation de l'activité motrice stimule le cortex moteur et le cervelet (vert).

Il est cependant important de souligner que la nature exacte des protocoles d'EE utilisés en recherche varie énormément d'un laboratoire à l'autre (pour revue : Simpson et Kelly, 2011). On note une variabilité notamment au niveau de (1) la taille des cages et le nombre d'animaux par cage, (2) le type d'objets utilisés, (3) l'âge des animaux lors de l'exposition à l'EE, (4) la durée de l'enrichissement, (5) le type de contrôle utilisé (isolation ou groupes), (6) la souche de Rat ou de Souris, (7) et leur sexe. L'ensemble de ces facteurs complexifient donc l'interprétation que l'on peut faire des données de la littérature.

II- Environnement enrichi et capacités mnésiques

1. Amélioration des capacités mnésiques par l'environnement enrichi

Les études concernant les effets de l'EE chez le Rongeur mettent en évidence de nombreuses modifications au niveau de l'encéphale, qui se répercutent sur le comportement des animaux (pour revues : van Praag et coll., 2000 ; Nithianantharajah et Hannan, 2006).

Il est par exemple largement établi que l'exposition à un EE améliore les fonctions mnésiques des Rongeurs dans de nombreuses tâches dépendantes de l'hippocampe, évaluant la mémoire spatiale (Leggio et coll., 2005 ; Schrijver et coll., 2002 ; Williams et coll., 2001), la mémoire de reconnaissance (Bruel-Jungerman et coll., 2005 ; Tang et coll., 2001) ainsi que la mémoire de peur (Barbelivien et coll., 2006 ; Duffy et coll., 2001 ; Rampon et coll., 2000(a) ; Tang et coll., 2001). Il est par ailleurs intéressant de noter que l'exposition à un EE réduit l'anxiété des animaux et augmente leur activité exploratoire (Chapillon et coll., 1999 ; Roy et coll., 2001 ; Benaroya-Milshtein et coll., 2004). Ainsi, dans le MWM par exemple, les animaux exposés à un EE apprennent plus rapidement la tâche, présentent une meilleure adaptation au dispositif expérimental et possèdent des habiletés locomotrices supérieures en comparaison aux animaux élevés en conditions standard (Kempermann et coll., 2002).

Certains facteurs physiologiques peuvent également être influencés par l'exposition à un EE, ce qui pourrait contribuer à l'amélioration des fonctions cognitives observée suite à l'enrichissement. L'exposition à un EE est par exemple capable de réduire la réactivité au stress des animaux (Lemaire et coll., 1999 ; Meerlo et coll., 1999 ; Belz et coll., 2003 ; Moncek et coll., 2004 ; Wright et Conrad, 2008 ; Pena et coll., 2009), ce qui se traduit par une réduction des concentrations en hormones du stress, comme l'ACTH et la corticostérone chez le Rat (Belz et coll., 2003 ; Pena et coll., 2009). Les animaux 'enrichis' sont donc capables de mieux s'adapter à de nouvelles situations, comme un nouvel environnement par exemple, notamment grâce à cette diminution de la réponse hormonale au stress (Belz et coll., 2003). Ceci leur permet, entre autres, d'explorer l'environnement de manière plus efficace. Des études montrent par ailleurs que l'exposition à un EE augmente l'expression des récepteurs aux GC, ce qui pourrait expliquer les meilleures capacités d'adaptation au stress des animaux

enrichis (Olsson et coll., 1994 ; Mohammed et coll., 1993). Il est intéressant de noter que cette augmentation du nombre de récepteurs aux GC permet d'atténuer l'atteinte hippocampique induite par un stress chronique (Wright et Conrad, 2008).

Plusieurs études ont montré que cette meilleure adaptation aux situations stressantes des animaux enrichis permet de diminuer les déficits mnésiques induits normalement par le stress. Par exemple, l'exposition à un EE est capable de prévenir les déficits de mémoire spatiale induits par un stress chronique (Wright et Conrad, 2008). Cet effet bénéfique de l'EE sur les capacités cognitives en réponse à un stress est souligné par les études de Larsson et collaborateurs, qui ont montré que l'exposition à un stress avant un apprentissage en MWM entraîne des effets différents sur les aptitudes des Rongeurs à réaliser la tâche en fonction de leurs conditions de stabulation. Par exemple, l'exposition à un stress moyen avant l'apprentissage améliore les performances dans le groupe de rats enrichis, alors qu'il n'induit aucun effet chez les rats élevés en conditions standard. Si l'on induit par contre un stress aigu (entraînant une forte libération de GC), on observe alors des déficits dans les 2 groupes de rats (standards et enrichis), mais ceux-ci s'avèrent plus marqués chez les animaux élevés en conditions standard (Larsson et coll., 2002).

Ainsi, l'exposition à un EE favorise la régulation de l'axe HPA en réponse à un événement stressant, en diminuant son activité. Ceci confère aux animaux enrichis une meilleure adaptation aux différentes situations stressantes, ce qui contribue à l'amélioration de leurs capacités mnésiques.

En conclusion, l'exposition à un EE permet d'améliorer les capacités notamment mnésiques des animaux. Outre une meilleure adaptation au stress des animaux enrichis, qui pourrait participer aux effets bénéfiques de l'EE sur les capacités mnésiques, un certain nombre de changements au niveau cellulaire et moléculaire sont également induits par l'EE, et ce dans les structures cérébrales impliquées dans la mémoire, comme l'hippocampe. Ces changements pourraient donc de ce fait être impliqués dans l'amélioration des capacités mnésiques observée suite à l'enrichissement.

2. Mécanismes cellulaires mis en jeu par l'environnement enrichi

L'exposition des animaux à un EE favorise différents processus de plasticité cérébrale.

Plusieurs études pionnières ont par exemple montré que l'EE induit différents changements morphologiques dans l'encéphale. Il affecte notamment le poids de l'encéphale, l'épaisseur du cortex et la taille des corps cellulaires des neurones (Bennett et coll., 1969 ; Diamond et coll., 1972 ; 1976). Par la suite, plusieurs travaux ont également mis en évidence une augmentation de l'arborisation dendritique, du nombre d'épines dendritiques, ainsi que de la taille des synapses au niveau de certaines populations neuronales (Greenough et coll., 1973, 1985 ; Connor et coll., 1982 ; Connor et Diamond, 1982 ; Leggio, 2005).

L'exposition à un EE entraîne par ailleurs une augmentation de la plasticité synaptique de l'hippocampe, associée à une facilitation de la LTP. Des travaux réalisés au niveau de l'hippocampe chez le rongeur indiquent que l'EE facilite l'induction de la LTP et contribue ainsi au renforcement synaptique (Foster et coll., 1996 ; Duffy et coll., 2001 ; Artola et coll., 2006 ; Li et coll., 2006 ; Arai et coll., 2009). Ceci pourrait de ce fait participer à l'amélioration des capacités mnésiques observée suite à l'enrichissement.

La neurogénèse adulte dans le gyrus denté est également modulée par l'EE. En effet, une exposition à un EE favorise la survie des neurones nouvellement formés ainsi que leur intégration fonctionnelle dans la circuiterie existante (Kempermann, 1997 ; Nilsson et coll., 1999 ; van Praag, 1999 ; Bruel-Jungerman et coll., 2005). Or, nous avons vu dans le chapitre précédent (Vieillessement et neurogénèse hippocampique, page 78 du manuscrit) que plusieurs études ont établi une corrélation entre la neurogénèse et l'amélioration de certains types de mémoire dépendants de l'hippocampe (pour revues : Kempermann, 2008 ; Suh et coll., 2009). Ainsi, l'augmentation de la neurogénèse induite par l'EE pourrait contribuer à l'amélioration des capacités mnésiques observée chez les animaux enrichis. Cette hypothèse est appuyée d'une part par les résultats de Nilsson et collaborateurs, qui ont montré que l'augmentation de la neurogénèse observée suite à l'EE est corrélée à de meilleures capacités de mémoire spatiale dans le MWM (Nilsson et coll., 1999), et d'autre part, par ceux de Bruel-Jungerman et collaborateurs, qui ont montré que l'inhibition pharmacologique de la neurogénèse avec des anti-mitotiques durant l'exposition à un EE empêche l'amélioration des capacités de mémoire de reconnaissance, induite normalement par l'EE (Bruel-Jungerman et coll., 2005).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'amélioration des capacités mnésiques observée suite à l'enrichissement peut, en partie au moins, être expliquée par l'augmentation des processus de plasticité synaptique et de neurogénèse dans l'hippocampe, induite par l'EE.

3. Mécanismes moléculaires mis en jeu par l'environnement enrichi

Nous avons vu que l'EE induit une amélioration des capacités cognitives en favorisant notamment la plasticité synaptique et la neurogénèse. Ces différents effets de l'EE peuvent s'expliquer par le fait que l'EE module la transcription de gènes et la synthèse de protéines, impliquées dans les processus de plasticité synaptique et de mémorisation (Rampon et coll., 2000 (b) ; Keyvani et coll., 2004 ; McNair et coll., 2007 ; Mora et coll., 2007 ; Thiriet et coll., 2008).

On observe par exemple suite à l'enrichissement une augmentation de la transcription et des niveaux protéiques de certaines sous-unités des récepteurs NMDA et AMPA. Celles-ci intègrent ensuite la signalisation glutamatergique dans l'hippocampe (Tang et coll., 2001 ; Naka et coll., 2005) et participent ainsi à la facilitation de la LTP observée en réponse à l'EE.

La régulation de l'expression d'un autre groupe de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire – les neurotrophines – est également particulièrement sensible à l'EE (Torasdotter et coll., 1998 ; Pham et coll., 1999 ; Ickes et coll., 2000). On observe en effet une augmentation des niveaux de BDNF dans plusieurs structures cérébrales dont l'hippocampe, suite à une exposition à un EE (Ickes et coll., 2000). Il en est de même pour le NGF, qui présente des taux plus élevés dans l'hippocampe suite à l'enrichissement, ce qui est associé à une amélioration des performances d'acquisition en MWM (Pham et coll., 1999). L'activité physique volontaire, une composante de certains protocoles d'enrichissement, est également capable d'induire la transcription du *bdnf* ainsi que l'activation de protéines, comme des MAPK ou encore CREB, impliquées dans les processus de plasticité synaptique sous-tendant la mémoire (Cotman et Berchtold, 2002 ; Molteni et coll., 2002). Or, nous avons vu précédemment (voir partie Bases moléculaires de la mémoire, page 14 du manuscrit) que les neurotrophines, et notamment le BDNF, sont impliquées dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire. Il a par ailleurs été montré que le BDNF

est nécessaire à l'augmentation de la neurogénèse hippocampique induite par un EE (Rossi et coll., 2006). Ainsi, l'augmentation du BDNF induite en réponse à l'enrichissement contribue aux effets bénéfiques de l'EE sur les capacités mnésiques et sur les processus de plasticité synaptique et de neurogénèse.

La modulation de l'expression de ces gènes par l'EE fait intervenir deux niveaux de régulation. En effet, l'EE agit à la fois au niveau des facteurs de transcription et au niveau de la structure de la chromatine.

On note par exemple une augmentation des niveaux d'expression du facteur de transcription CREB dans l'hippocampe suite à une exposition à un EE (Huang et coll., 2007). Par ailleurs, certaines études ont montré que l'activité physique volontaire favorise l'activation de CREB (Cotman et Berchtold, 2002 ; Molteni et coll., 2002). Or, on sait que la forme active de CREB est impliquée dans les processus de plasticité synaptique mais également de neurogénèse (Walton et coll., 1999 ; Jagasia et coll., 2009 ; pour revue : Merz et coll., 2011). Il est intéressant de souligner par exemple que l'activation de CREB, *via* la calmoduline, est essentielle à l'augmentation de la neurogénèse et à l'amélioration de la mémoire spatiale induites en réponse à l'EE (Zhong et coll., 2009).

Concernant plus particulièrement les effets de l'EE sur la structure de la chromatine, l'enrichissement conduit à un remodelage de la chromatine, en induisant notamment des modifications de l'acétylation des histones dans l'hippocampe.

Les travaux de Tsai et collaborateurs (Fischer et coll., 2007) montrent par exemple qu'un EE chez la Souris adulte induit une augmentation des niveaux d'acétylation globale des histones H3 et H4 dans l'hippocampe, associée à de meilleures performances d'acquisition en MWM et en CFC. Cette amélioration peut être mimée grâce à un traitement aux HDACi (Sodium butyrate). Il est particulièrement intéressant de souligner que dans un modèle de neurodégénérescence (CaMKII-p25) présentant d'importants déficits mnésiques, l'exposition à un EE durant 4 semaines, ainsi qu'un traitement aux HDACi, permettent de restaurer ces capacités mnésiques. Ces données confirment donc l'implication du remodelage de la chromatine dans la formation de la mémoire, et soulignent que l'amélioration des capacités mnésiques induite par l'EE est, au moins en partie, due à l'augmentation de l'acétylation des histones dans l'hippocampe suite à l'enrichissement.

Plus récemment, Barco et collaborateurs (Lopez-Atalaya et coll., 2011) ont démontré l'implication des mécanismes épigénétiques, et notamment l'acétylation des histones, dans l'augmentation de la neurogénèse induite par l'EE. Grâce à l'utilisation de modèles transgéniques placés dans des conditions d'élevage en EE, ces auteurs ont montré qu'une perturbation de l'activité HAT de CBP entraîne une perte de l'augmentation de la neurogénèse ainsi que de l'amélioration des capacités mnésiques induites normalement par l'EE, dans certaines tâches comme le MWM. La perte, dans ces modèles, de l'augmentation de la neurogénèse en réponse à l'EE est associée à une perturbation de la transcription de gènes impliqués dans le processus de neurogénèse. On note par exemple une diminution de la transcription du gène codant la nestine (protéine des filaments intermédiaires impliquée dans la neurogénèse et la différenciation neuronale) dans ces modèles. L'altération de la transcription de ces gènes s'explique notamment par la suppression, au niveau de leurs promoteurs, de la dynamique d'acétylation des histones H2B et/ou H3 induite normalement par l'EE. Les résultats de cette étude renforcent donc l'idée d'une implication fonctionnelle de la neurogénèse adulte dans l'hippocampe dans certains processus de mémoire dépendants de l'hippocampe. Ils indiquent par ailleurs que l'augmentation de la neurogénèse hippocampique induite par l'EE nécessite l'activation de la transcription de gènes impliqués dans le processus de neurogénèse, *via* des mécanismes d'acétylation de certaines histones.

L'ensemble de ces données démontre que l'EE module la régulation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémorisation, en favorisant notamment l'acétylation de certaines histones au niveau des promoteurs de ces gènes, ce qui participe à l'amélioration des performances mnésiques observée suite à l'enrichissement.

Les études concernant l'EE mettent donc en évidence de nombreux changements au niveau de régions cérébrales critiques pour les processus d'apprentissage et de mémorisation. Dans l'hippocampe, structure essentielle à l'apprentissage spatial, l'élevage en EE améliore les processus de plasticité synaptique et entraîne une augmentation de la neurogénèse adulte. Ceci est associé à une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans les phénomènes de plasticité et de mémoire, comme le *bdnf* par exemple. La combinaison de ces

différents effets induits par l'EE contribue ainsi à l'amélioration des capacités mnésiques dépendantes de l'hippocampe, observée suite à l'enrichissement. Or, le vieillissement est accompagné d'un déclin cognitif notamment au niveau des processus mnésiques dépendants de l'hippocampe. Au vue de ces données, il paraît essentiel de s'intéresser aux effets d'une exposition à un EE sur les déficits mnésiques liés à l'âge.

III- Environnement enrichi *versus* vieillissement

Plusieurs études ont mis en évidence une certaine conservation de la plasticité cérébrale avec l'âge (Greer et coll., 1981). A partir de ce constat, de nombreux travaux ont examiné les effets d'un EE sur la mémoire et la plasticité de l'hippocampe chez le Rongeur, à un âge moyen (*middle-age* : 14-19 mois) et à un âge avancé (>20 mois).

Chez le Rongeur '*middle age*', l'EE augmente l'arborisation dendritique, le poids du cerveau antérieur, ainsi que les niveaux de neurotrophines dans le néocortex (Green et coll., 1983 ; Cummins et coll., 1973). Si l'on se focalise plus particulièrement sur l'hippocampe, l'enrichissement augmente la neurogénèse (Kempermann et coll., 1998) et les niveaux de facteurs neurotrophiques (Pham et coll., 1999 ; Ickes et coll., 1998 ; Obiang et coll., 2011). Concernant les effets de l'EE sur l'apprentissage et la mémoire, les quelques données disponibles à ce jour montrent que l'exposition à un EE induit une amélioration des capacités mnésiques chez le Rongeur '*middle age*', tout comme cela a été observé chez le Rongeur jeune adulte. Plusieurs études montrent par exemple une amélioration de la mémoire spatiale testée en MWM chez des animaux '*middle age*' enrichis en comparaison à ceux élevés en environnement standard (Frick et coll., 2003 ; Pham et coll., 1999 ; Kempermann et coll., 1998 ; Gresack et coll., 2007).

Il est intéressant de constater que cette amélioration des capacités mnésiques observée suite à l'EE est toujours possible même à un âge avancé chez le Rongeur. L'EE améliore en effet chez le Rongeur âgé certains type d'apprentissage et de mémoire, comme la reconnaissance d'objet (Gresack et coll., 2007 ; Leal-Galicia et coll., 2008) et la mémoire spatiale évaluée en MWM (Bennett et coll., 2006 ; Frick et Fernandez, 2003 ; Harati et coll., 2009 ; Harburger et coll., 2007), induisant notamment un apprentissage plus rapide de la tâche chez les rongeurs âgés enrichis comparés aux rongeurs âgés standards (Frick et Fernandez, 2003).

Même à un âge avancé chez le Rongeur, l'exposition à un EE favorise les processus de plasticité dans l'hippocampe. On note en effet en réponse à l'EE une réduction de la gliogénèse (Soffié et coll., 1999), une augmentation de l'arborisation dendritique ainsi qu'une augmentation de la densité des épines dendritiques dans le gyrus denté (Darmopil et coll., 2009). La neurogénèse hippocampique est également augmentée suite à l'EE chez le Rongeur

âgé (Segovia et coll., 2006 ; Kempermann et coll., 2002) et on observe une augmentation des niveaux de BDNF par rapport aux rats âgés standards (Segovia et coll., 2008). Certaines de ces modifications induites par l'EE ont d'ailleurs été corrélées à l'amélioration des capacités mnésiques observée chez le Rongeur âgé enrichi. Par exemple, l'amélioration des performances de mémoire spatiale dans les tests du MWM ainsi que de reconnaissance d'objets est corrélée à une augmentation de la neurogénèse hippocampique chez les souris âgées enrichies (Frick et Fernandez, 2003 ; Kempermann et coll., 1998 ; Leal-Galicia et coll., 2008). Enfin, il est intéressant de préciser que l'EE diminue la réactivité au stress des animaux, et ce même à un âge avancé (24 mois) (Segovia et coll., 2008). Or, nous avons vu dans le chapitre précédent que le vieillissement provoque une dérégulation de l'axe HPA en réponse à un événement stressant, ce qui entraîne une hyperréactivité au stress chez les animaux âgés et peut ainsi contribuer aux déficits mnésiques liés à l'âge. La meilleure gestion du stress des animaux âgés enrichis pourrait donc participer à l'amélioration des capacités mnésiques observée suite à l'enrichissement.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 Vieillesse et mémoire de l'introduction, le vieillissement induit une diminution des processus de plasticité notamment au niveau de l'hippocampe (LTP, neurogénèse), ce qui favorise le déclin des capacités mnésiques lié à l'âge. L'amélioration des processus de plasticité observée suite à l'enrichissement permet donc de contrebalancer les effets négatifs du vieillissement sur les fonctions mnésiques, et par conséquent, de maintenir les aptitudes mnésiques chez le Rongeur âgé (figure 32).

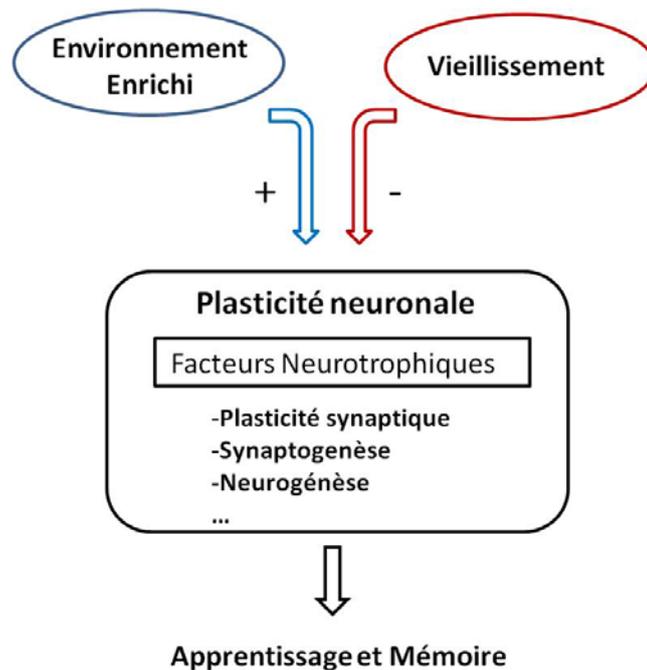


Figure 32 : Schéma illustrant l'interaction EE/vieillessement. Ce modèle souligne l'importance de l'interaction entre l'EE et le vieillissement sur les différents processus de plasticité dans l'hippocampe. L'exposition à un EE favorise les processus de plasticité et contrebalance ainsi les effets négatifs liés au vieillissement. Ceci aboutit *in fine* au maintien de certaines fonctions cognitives, et notamment des capacités mnésiques.

Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'un certain nombre de facteurs varient entre les différents protocoles d'enrichissement utilisés, et peuvent influencer les effets de l'EE sur les processus de plasticité et de mémoire. Les effets observés dépendent en effet de l'espèce (Rat/Souris), de la souche, du sexe, du niveau de complexité de l'environnement, mais également de l'âge auquel l'animal a été exposé à l'enrichissement et de la durée de l'exposition à l'EE. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à ces deux derniers points.

Bien que de nombreuses études mettent en évidence des effets bénéfiques de l'EE lorsque celui-ci débute à un âge avancé chez le rongeur (Bennett et coll., 2006 ; Segovia et coll., 2006 ; Frick et Fernandez, 2003 ; Harburger et coll., 2007), il est important de tenir compte de ces facteurs, qui jouent un rôle critique dans le cadre des études sur le vieillissement. En effet, des travaux réalisés chez la souris ont montré que l'exposition de souris âgées de 17 mois à un EE de 3 mois n'empêche pas l'apparition des déficits mnésiques

liés à l'âge (Bouet et coll., 2011), alors qu'une exposition de 6 mois à un EE à un âge moins avancé (14 mois) prévient ces déficits chez les animaux âgés (Freret et coll., 2011). Au contraire, une étude conduite par Kobayashi et collaborateurs sur le Rat montre qu'un enrichissement de 3 mois à partir de l'âge de 18 mois est capable d'améliorer les fonctions mnésiques dans le labyrinthe de Hebb-Williams chez le Rat âgé. Les auteurs ont par ailleurs observé qu'une exposition sur toute la vie (*lifelong*) induit des changements plus prononcés (Kobayashi et coll., 2002). Ces résultats sont confirmés par d'autres études qui ont mis en évidence qu'un enrichissement mené sur toute la vie de l'animal améliore les performances en MWM chez les rongeurs à un âge avancé (Gresack et coll., 2007 ; Harati et coll., 2009). Par ailleurs, il est intéressant de noter que les effets de l'EE persistent plusieurs mois après la fin de l'exposition et que la durée pendant laquelle ces effets se maintiennent augmente avec la durée d'exposition à l'EE (Amaral et coll., 2008).

Ces données indiquent donc que l'EE permet de prévenir les déficits mnésiques liés à l'âge, à condition néanmoins de prendre en compte l'espèce étudiée (Rat/Souris), ainsi que l'âge du Rongeur au moment de l'exposition à l'EE et la durée de cet enrichissement.

OBJECTIFS GENERAUX

CONTEXTE SCIENTIFIQUE DU TRAVAIL DE THESE

ET

OBJECTIFS GENERAUX

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés tout particulièrement sur les mécanismes moléculaires qui participent à l'établissement d'un souvenir durable (mémoire à long terme). Ces processus dépendent initialement d'une région particulière du cerveau : l'hippocampe dorsal. La formation de la mémoire à long terme nécessite la transcription de gènes et la synthèse de nouvelles protéines. De manière générale, les modifications épigénétiques influencent la structure de la chromatine et contrôlent ainsi l'accès des facteurs de transcription au niveau des promoteurs de gènes. Les HATs participent à ces changements de la structure de la chromatine en catalysant l'acétylation des histones (sur les nucléosomes), ce qui, en général, est associé à une activation transcriptionnelle des gènes. Plusieurs études ont montré que les HATs, et notamment CBP, sont impliquées dans les processus mnésiques en favorisant la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire (pour revue : Graff et coll., 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment, le vieillissement normal s'accompagne de troubles cognitifs, dont des troubles de la mémoire. Ces déficits mnésiques sont corrélés à une perturbation de la plasticité hippocampique (plasticité synaptique, neurogénèse), due notamment à une dérégulation de la transcription de gènes impliqués dans ces processus. Il se pourrait qu'un dysfonctionnement des mécanismes épigénétiques puisse, au moins en partie, contribuer à l'altération de la transcription de ces gènes. Deux études récentes viennent

appuyer cette hypothèse. Ces travaux indiquent en effet qu'une perturbation des mécanismes d'acétylation des histones est observée lors du vieillissement. Celle-ci semble contribuer à l'altération de la transcription des gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire et participer ainsi au déclin mnésique lié à l'âge (Peleg et coll., 2010 ; Zeng et coll., 2011).

Au contraire, une exposition à un EE est capable de contrer les effets négatifs du vieillissement sur les capacités mnésiques, en favorisant les processus de plasticité hippocampique, *via* notamment une activation de la transcription des gènes impliqués dans ces processus. Une étude menée chez le Rongeur jeune adulte a par ailleurs montré que les effets bénéfiques de l'enrichissement pouvaient en partie s'expliquer par des changements au niveau de la structure de la chromatine (Fischer et coll., 2007).

L'objectif général de ce travail de thèse est de comprendre l'implication des mécanismes génétiques et épigénétiques, liés à l'acétylation des histones, dans les processus mnésiques, en particulier au cours de la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe (article 1 : mémoire spatiale ; article 3 : mémoire spatiale et mémoire de peur au contexte). Nous avons également essayé de comprendre si et de quelle manière l'exposition à un EE, capable de réactiver les processus mnésiques, pouvait avoir un impact sur ces mécanismes liés à l'acétylation des histones chez le Rat âgé (article 2).

Une première étape du projet a été d'identifier les mécanismes d'acétylation des histones impliqués dans la consolidation de la mémoire spatiale chez le Rat jeune adulte (3-4 mois) (article 1). Pour ce faire, nous avons analysé les profils d'expression de certaines HATs connues pour être impliquées dans les processus de plasticité et de mémoire, comme CBP, p300 et PCAF, ainsi que les niveaux d'acétylation des différentes histones (H2A, H2B, H3 et H4), et ce dans l'hippocampe dorsal de Rat, suite à un apprentissage spatial (3 jours d'acquisition en MWM). Nous avons ensuite évalué l'impact fonctionnel de ces changements au niveau de la régulation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, comme le *bdnf* par exemple.

Une fois ces mécanismes identifiés, nous nous sommes intéressés à leur implication potentielle dans le maintien des capacités mnésiques (spatiales) observé chez les rats âgés exposés à un EE tardif (de l'âge de 18 mois à l'âge de 24 mois) (article 2) (figure 33). Ces mécanismes d'acétylation des histones ont été étudiés à la fois en conditions basales et dans un contexte d'apprentissage (conditions de l'article 1), chez les rats âgés exposés à l'EE tardif, en comparaison à des rats du même âge élevés en conditions standard. Afin d'évaluer l'impact de ces mécanismes d'acétylation au niveau fonctionnel, nous nous sommes intéressés à la régulation de la transcription de différents exons du *bdnf* en réponse à l'EE.

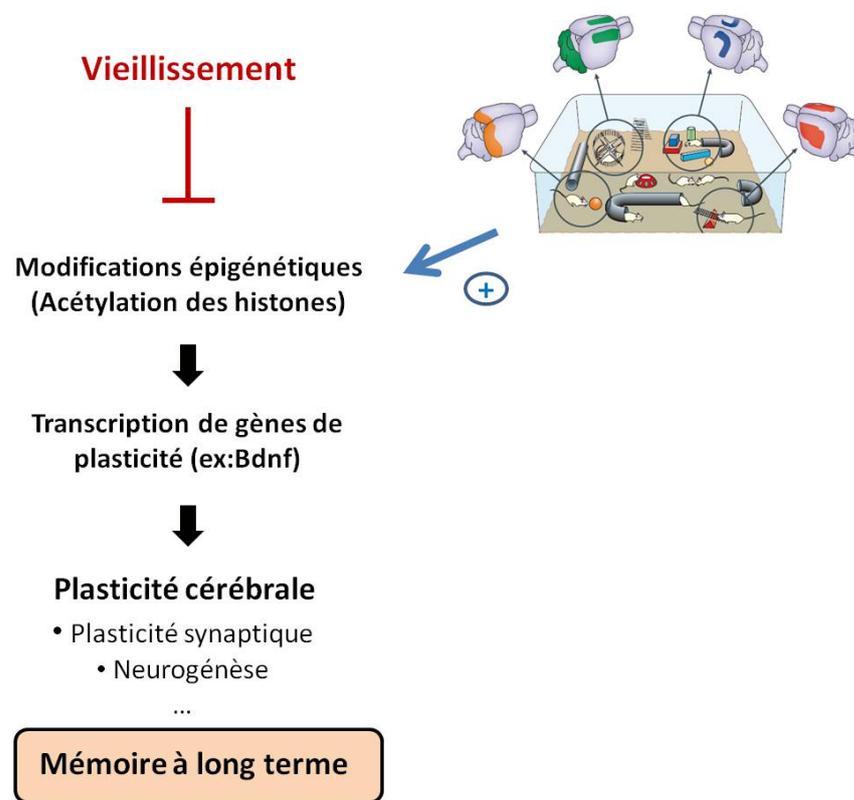


Figure 33 : Hypothèse de travail pour expliquer le maintien des capacités mnésiques par un EE lors du vieillissement.

Pour finir, nous avons cherché à préciser l'implication de l'acétylation des différentes histones dans les processus sous-tendant la consolidation des souvenirs hippocampo-dépendants chez le Rongeur jeune adulte. Dans ce but, nous avons tout d'abord analysé leur dynamique d'acétylation, *in vitro*, suite à l'activation des récepteurs NMDA dans une culture

primaire de neurones glutamatergiques. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication spécifique de l'acétylation de chacune des histones H2B, H3 et H4 dans la consolidation d'un souvenir dépendant de l'hippocampe, et ce dans deux tâches d'apprentissage différentes (MWM et CFC), afin de voir si les résultats obtenus sont spécifiques d'une tâche particulière ou s'ils peuvent être généralisés à un processus plus global d'apprentissage dépendant de l'hippocampe (article 3).

Pris dans son ensemble, ce projet de thèse a pour but de souligner l'importance des mécanismes liés aux acétylations des histones dans la consolidation des souvenirs dépendants de l'hippocampe et de montrer que ces mécanismes sont susceptibles d'être modulés au cours de la vie (i.e. vieillissement et enrichissement), ce qui impacte sur les capacités mnésiques de l'individu.

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE

ARTICLE 1

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 et Anne-Laurence Boutillier

Neuropsychopharmacology, 2010 Dec ; 35(13) : 2521-253.

Contexte scientifique et objectifs

La consolidation est le processus par lequel de nouvelles informations sont graduellement transformées d'un état labile en souvenirs stables (Müller et Pilzecker, 1900 ; McGaugh, 2000). Elle implique une réorganisation au niveau des synapses et des systèmes (Dudai, 2004). On note en effet une consolidation rapide, également appelée consolidation synaptique, qui se traduit par la croissance de nouvelles connexions synaptiques et la restructuration de connexions existantes, ce qui permet une stabilisation initiale dans les circuits de l'hippocampe. Il existe également une consolidation lente ou consolidation systémique, due à la réorganisation graduelle des connexions entre et au sein des régions cérébrales qui sous-tendent la mémoire. Si l'on s'intéresse plus particulièrement au processus de consolidation synaptique, celui-ci se déroule rapidement après l'apprentissage et implique la transcription de certains gènes et une synthèse protéique *de novo* (Kandel, 2001).

La régulation de la transcription de ces gènes nécessite l'intervention de facteurs de transcription, associée à des modifications de la structure de la chromatine *via* la mise en jeu de modifications épigénétiques. Plusieurs études ont en effet mis en évidence l'implication directe des modifications épigénétiques, comme l'acétylation des histones, dans la formation de la mémoire. Il a par exemple été démontré que des modifications d'acétylation des histones sont induites par un apprentissage, en particulier au niveau des histones H3 et H4 (pour revue : Graff et coll., 2011).

L'acétylation des histones est un processus dynamique, catalysé par les HATs. Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre HATs et mémoire. Il a en effet été montré que l'activité HAT de CBP est nécessaire à la mise en place de processus impliqués dans la plasticité synaptique, comme la L-LTP, et dans la formation de la mémoire à long terme (Korzus et coll., 2004). Par ailleurs, de nombreuses études sur des souris transgéniques soulignent l'importance de CBP dans la formation de la mémoire à long terme (Chen et coll., 2010 ; Valor et coll., 2011 ; Barrett et coll., 2011 ; pour revue : Barrett and Wood, 2008). Il est important de préciser que CBP n'est pas la seule HAT impliquée dans les processus mnésiques. Des études récentes ont montré que d'autres HATs, comme p300 et PCAF, interviennent également dans la formation de la mémoire à long terme (Oliveira et coll., 2007 ; Maurice et coll., 2008 ; Oliveira et coll., 2011).

L'implication de l'acétylation des histones dans les processus mnésiques a par ailleurs pu être confirmée *via* l'utilisation de HDACi. Différentes études soulignent que l'augmentation pharmacologique des niveaux d'acétylation des histones suite à un traitement aux HDACi induit une amélioration des processus de plasticité associés aux fonctions mnésiques, comme la LTP par exemple (Levenson et coll., 2004 ; Alarcon et coll., 2004), ainsi qu'une amélioration des capacités mnésiques dans différents types de mémoire (pour revue : Fischer et coll., 2010) comme la mémoire de peur (testée en CFC) (Bredy et coll., 2007 ; Vecsey et coll., 2007 ; Fischer et coll., 2007), la mémoire spatiale (testée en MWM) (Fischer et coll., 2007) et la mémoire de reconnaissance d'objets (Stefanko et coll., 2009).

Bien que ces études témoignent clairement de la contribution des HATs et de l'acétylation des histones dans les processus mnésiques, aucune ne s'est intéressée à la régulation dynamique de ces enzymes durant la formation de la mémoire, et plus particulièrement pendant la phase de consolidation synaptique.

L'objectif de cette étude était donc d'analyser tout d'abord les profils d'expression de certaines HATs impliquées dans les processus mnésiques, telles que CBP, p300 et PCAF, dans l'hippocampe dorsal de rats jeunes adultes (3-4 mois), lors de la phase de consolidation d'un souvenir spatial. Nous avons ensuite cherché à étudier les profils d'acétylation des 4 histones composant le nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4). Enfin, nous avons évalué l'impact fonctionnel de ces changements au niveau la régulation de la transcription de certains gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, comme le *bdnf* par exemple.

Nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe dorsal car il est en effet établi que cette sous-région de l'hippocampe est particulièrement impliquée dans la mémoire spatiale (Fanselow et Dong, 2010).

Afin d'évaluer la mémoire spatiale, les rats ont été soumis à un protocole de mémoire de référence en MWM (groupe *hidden platform* HPf), le but de la tâche étant d'apprendre la localisation d'une plate-forme 'refuge' immergée, à l'aide d'indices distaux présents dans la pièce. L'apprentissage de cette tâche se traduit par une amélioration graduelle des

performances au fur et à mesure des jours d'acquisition, jusqu'à atteindre une phase de plateau lorsque l'on n'observe plus d'amélioration supplémentaire. On considère que la trace mnésique est totalement consolidée lorsque le plateau est atteint. Le but de notre étude étant d'analyser les mécanismes d'acétylation des histones au cours du processus de consolidation, il a donc tout d'abord fallu identifier la période adéquate de l'apprentissage, c'est-à-dire celle durant laquelle la plupart des événements moléculaires qui sont mis en jeu sous-tendent la phase de consolidation de la mémoire. Celle-ci correspond au moment où les performances présentent déjà une nette amélioration, avant néanmoins qu'elles n'atteignent la phase de plateau. Nous avons donc réalisé une expérience préliminaire de 5 jours d'acquisition afin d'identifier cette période critique. Aucune amélioration des performances n'étant plus observée à partir du 4^e jour d'acquisition, nous avons décidé de nous placer à la fin du 3^e jour pour nos analyses des mécanismes d'acétylation des histones (Supplemental figure 1). Les animaux ont été euthanasiés 1h après le dernier essai du 3^e jour d'acquisition afin de permettre la mise en place de la signalisation moléculaire et des régulations transcriptionnelles impliquées dans le processus de consolidation.

Afin de distinguer, au niveau des mécanismes d'acétylation des histones, les effets directement liés à l'apprentissage de ceux éventuellement induits par le dispositif expérimental lui-même, le groupe HPf a été comparé à un premier groupe contrôle, le groupe plate-forme visible (groupe *visible platform* VPf). Les animaux VPf sont en effet soumis à quelques conditions expérimentales similaires à celles des animaux HPf (nage par exemple), mais contrairement à eux, ils n'ont pas à apprendre la localisation de la plate-forme, celle-ci étant visible. Un deuxième groupe contrôle constitué d'animaux laissés dans leur cage, mais manipulés par l'expérimentateur (groupe *Home Cage*), a également été analysé afin d'évaluer ces mécanismes en conditions basales.

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}

¹Insem, 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 (2010) **35**, 2521–2537; doi:10.1038/npp.2010.117; published online 1 September 2010

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, Insem 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 in 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 $A = \epsilon LC$, with $\epsilon = 37\,000$ 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.

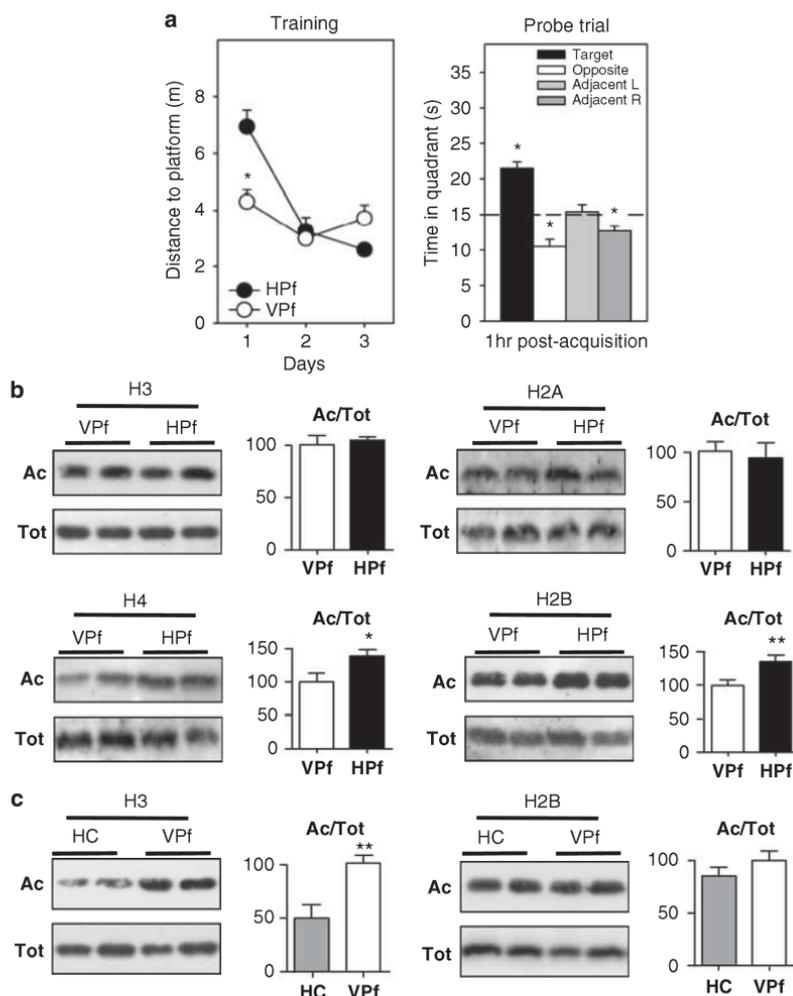


Figure 1 Specific increase of H2B/H4 acetylation levels in rat hippocampus during spatial memory formation. (a) Water maze performance in rats trained over 3 consecutive days (four trials per day) for spatial reference memory. Control rats had to swim toward a visible platform (VPf) whose location was 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). Lysine acetylations measured here are H3K9K14, H4K12, H2AK9, and H2BK5K12K15K20. Typical western blots are represented in duplicate. 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

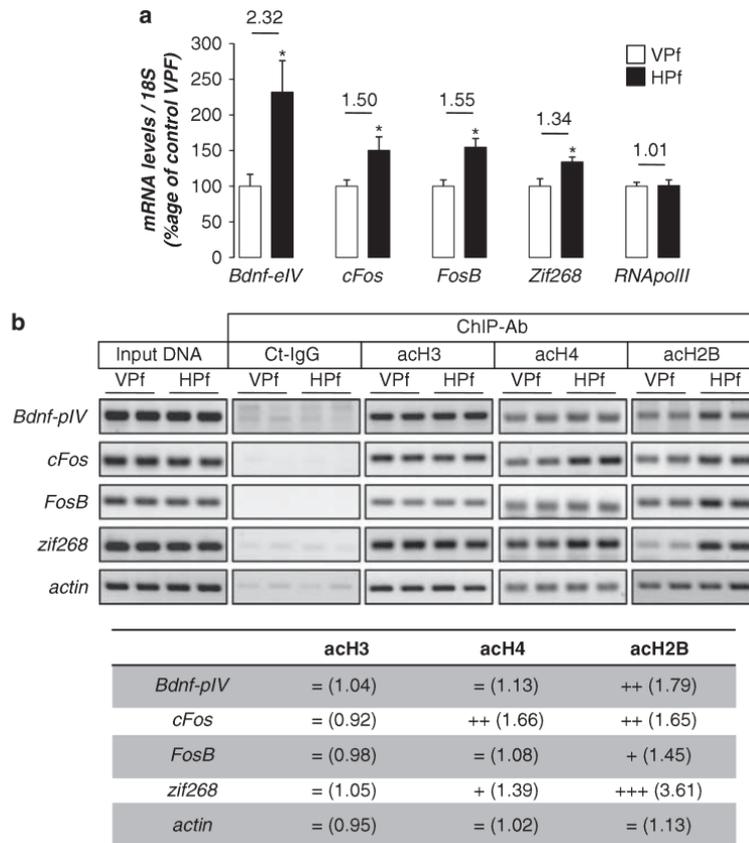


Figure 2 Several memory/plasticity-related genes present an acetylated-H2B/H4 enrichment on their promoters during the consolidation of a spatial memory. (a) mRNA expression levels of several CBP/memory-related genes: *bdnf-eIV*, *cFos*, *FosB*, and *zif268* were evaluated by RT-qPCR in the dorsal hippocampus 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

Gene	Fold induction (HPf versus VPf)	p values
<i>Cbp</i> (KAT3A)	1.66 *	0.0248
<i>p300</i> (KAT3B)	1.46 **	0.0055
<i>PCAF</i> (KAT2B)	1.34 *	0.0206
<i>Tip60</i> (KAT5)	1.18 ns	0.2167
<i>RNA pol II</i>	1.01 ns	0.9252

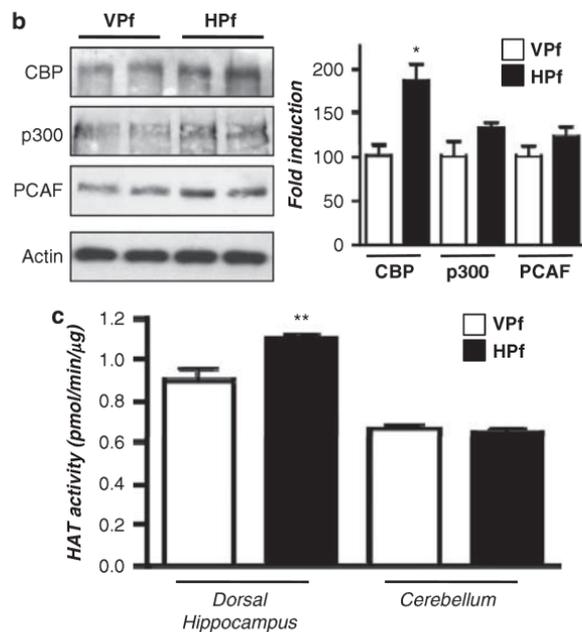


Figure 3 Increased expression level of several HATs and their activity during consolidation of a spatial memory. (a) HAT gene expression. mRNA expression levels of different genes were evaluated by RT-qPCR in the dorsal hippocampus of control (visible platform, VPf) and learning (hidden platform, HPf) 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 = εLC. 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

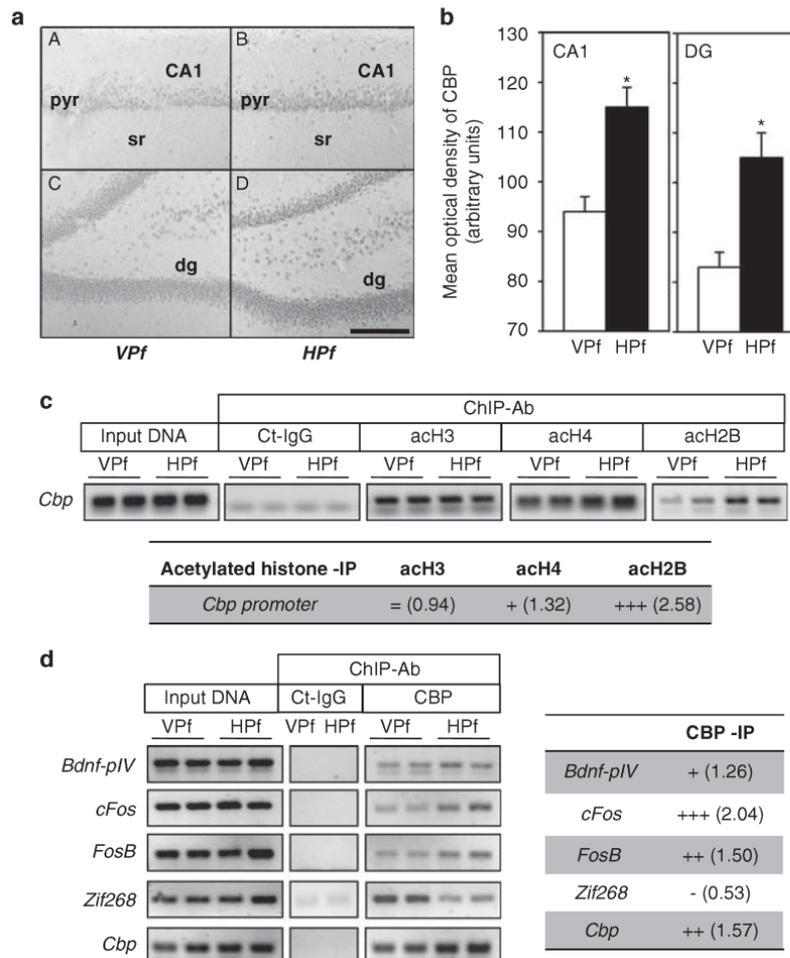


Figure 4 CBP-dependent regulations in the rat dorsal hippocampus during the formation of a spatial memory. (a) Representative images of CBP immunoreactive staining revealed with DAB staining in regions CA1 (A, B) and in the dentate gyrus (dg; C, D) of the dorsal hippocampus in representative VPf rats (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 (Image) 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 (Image) and fold inductions (f.i.) are indicated in the table on the right. *Bdnf-elV*: *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,

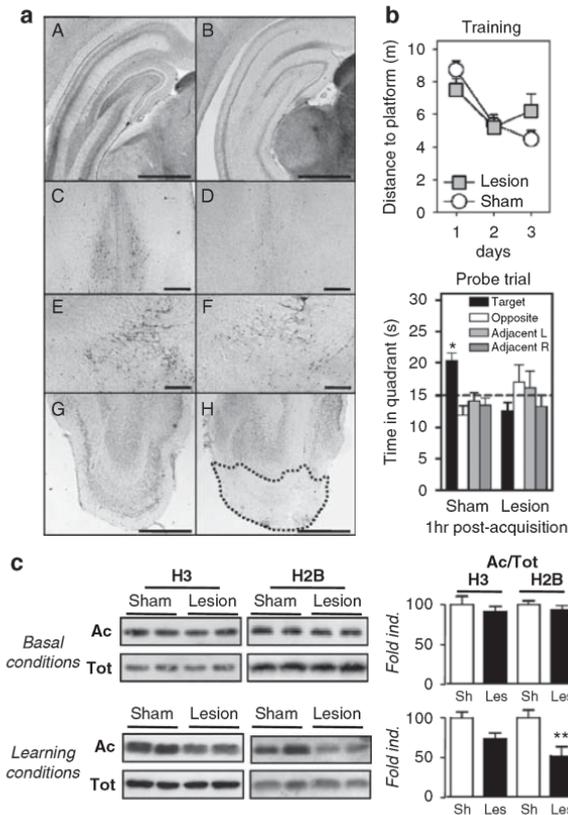


Figure 5 Histone acetylation levels in a cognitively impaired rat model. (a) Histological verification of the location and extent of cholinergic and entorhinal cortex (EC) lesions. A, C, E, and G are representative pictures of one sham-operated rat; B, D, F, and H are representative pictures of one rat 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

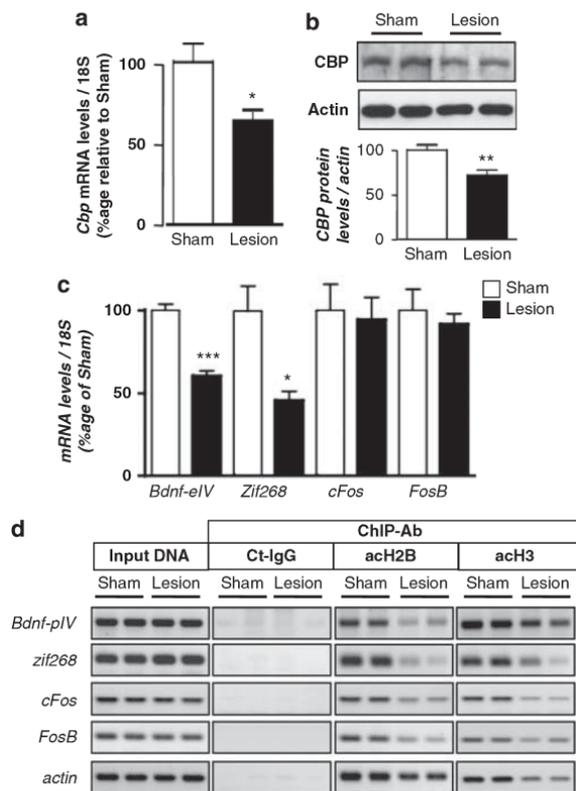


Figure 6 CBP- and histone acetylation-dependent regulations during formation of a spatial memory in a cognitively impaired rat model. *Cbp* transcripts (a) were evaluated by real-time RT-PCR ($n=5$) and CBP protein (b) by western blot analyses ($n=7$) in the dorsal hippocampus from sham-operated (sham) 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

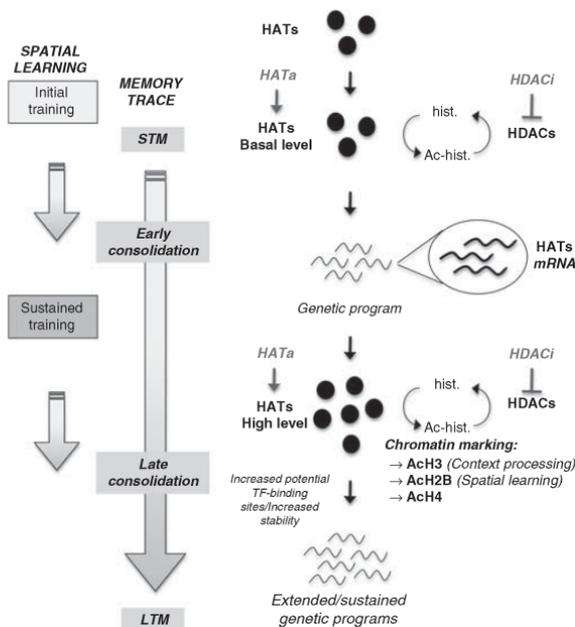


Figure 7 Hypothetical model of molecular interplay underlying consolidation of spatial memory. During the initial steps of a training aimed at acquiring a spatial task, the memory trace is progressively setup following a cascade of intracellular signals involved in short-term memory (STM) processing. 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, Gossweiler 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 engram? *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, Staniszevski 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 beitrage 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.
- Panteleva 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, Panteleva 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 Nikkon 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, Nuaillé, 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'	109,558,890
			R : 5'-AGCGGAACAGAGAAACTGGA-3'	109,559,074
<i>FosB</i>	308411 / NC_005100.2	(-) / 1	L : 5'-GTGAGGGGACTGCATCCTTA-3'	78,674,443
			R : 5'-GCTGGTGAAAAAGAGCAAGG-3'	78,674,338
<i>Zif268</i>	24330 / NC_005117.2	(+) / 18	L : 5'-ATGGGAGGTCTTCACGTCAC-3'	27,343,404
			R : 5'-CGAATCGGCCTCTATTTCAA-3'	27,343,543
<i>cbp</i>	24330 / NM_133381.2	(+) / 10	L : 5'-GTGAAGATGGCCGAGAACTT -3'	11,598,546
			R : 5'-CAACCTCACCTGTGCTGTCA -3'	11,599,226

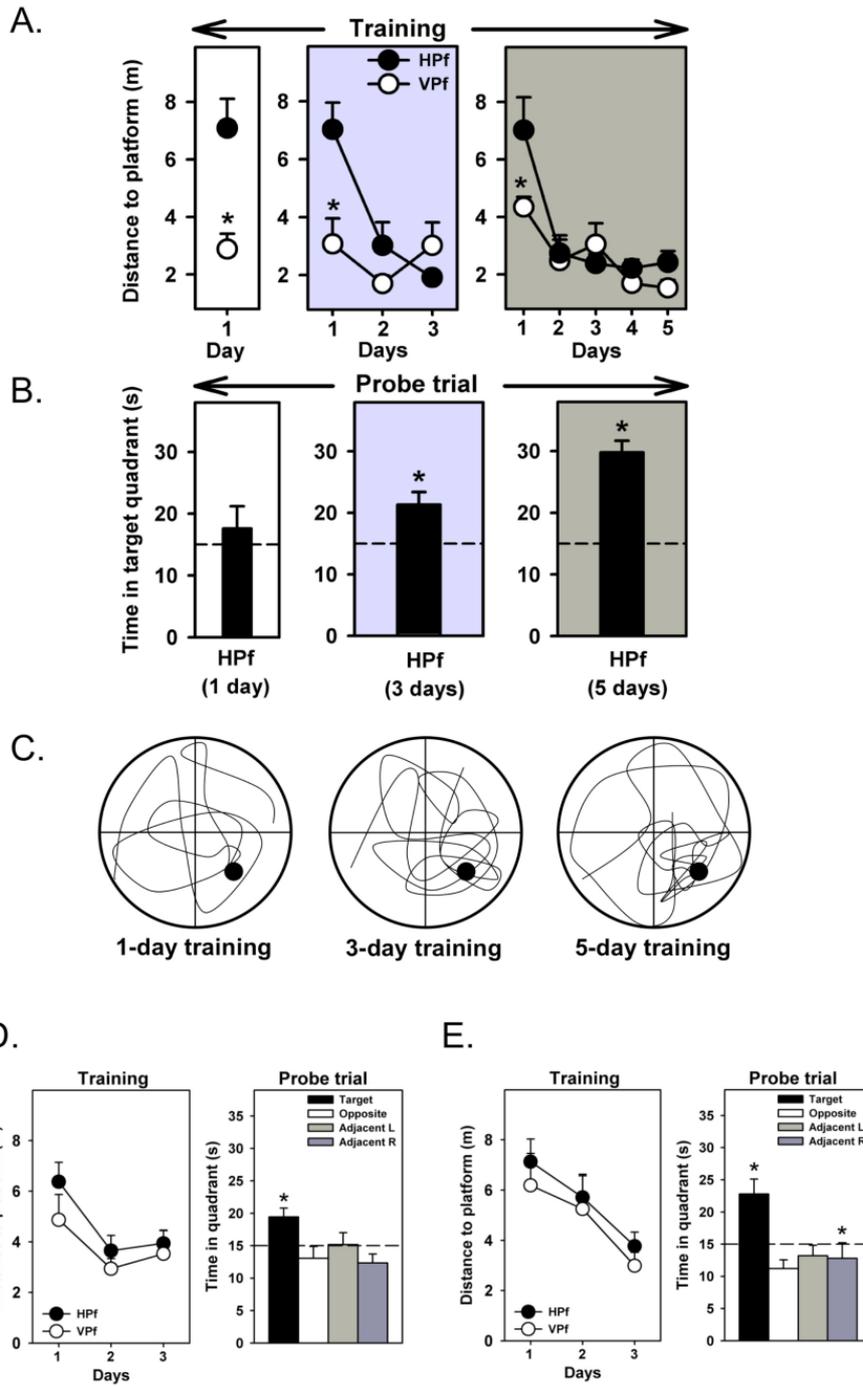


Figure S1

Cerebellum

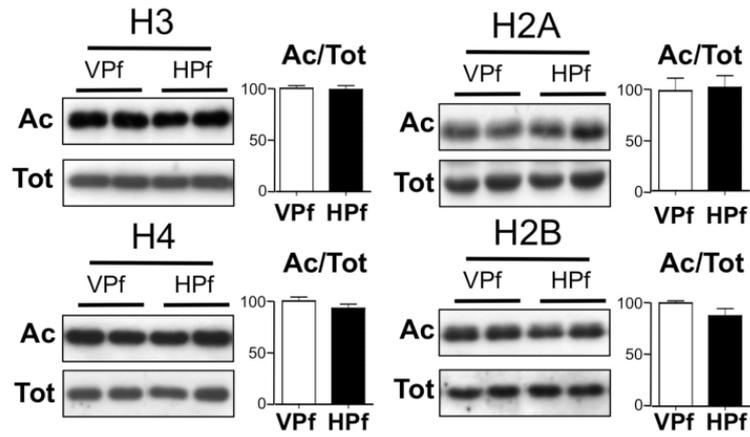


Figure S2

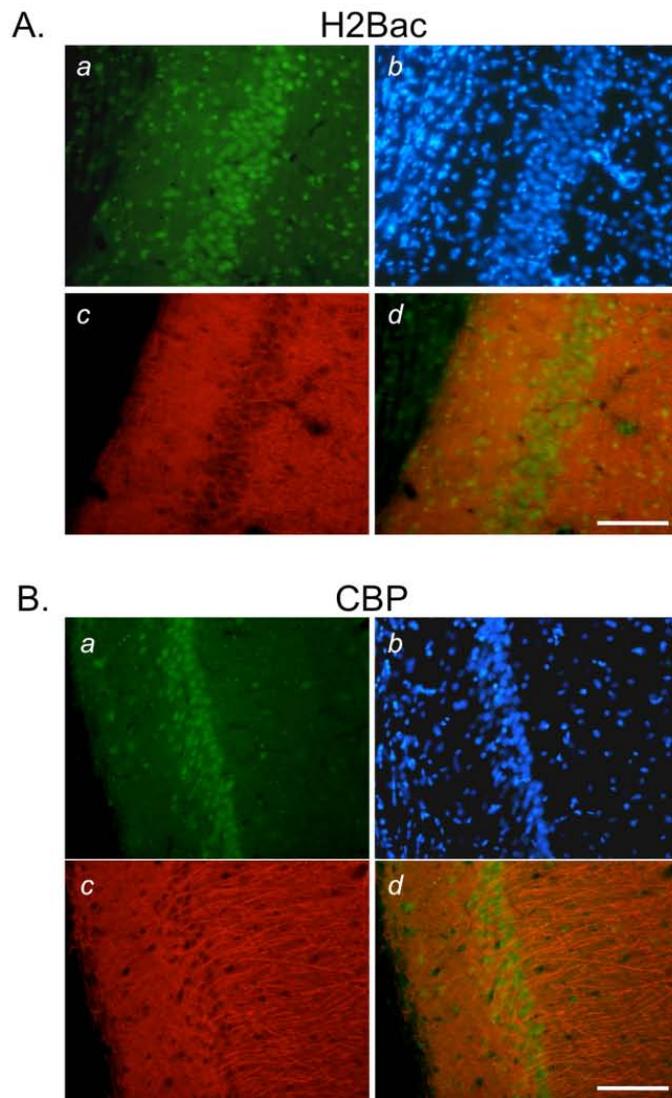
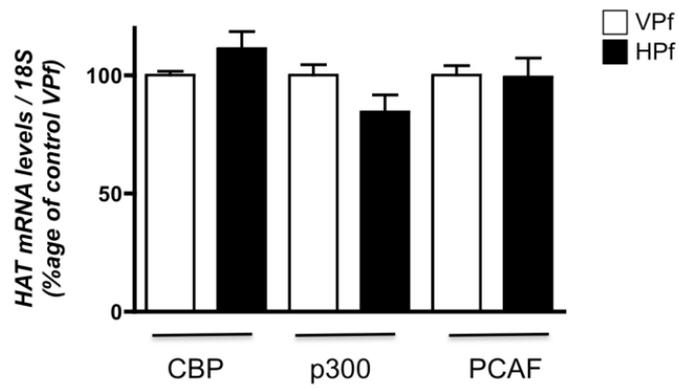


Figure S3

A.



B.

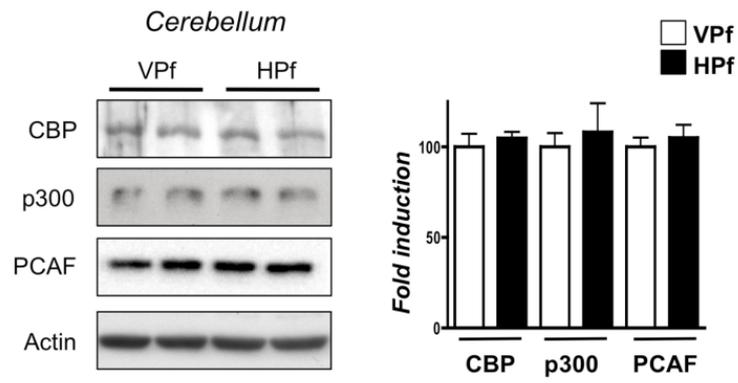
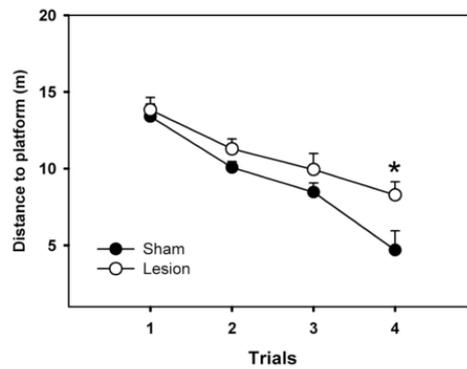


Figure S4

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.

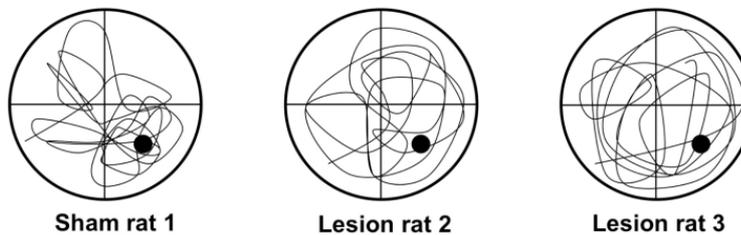


Figure S5

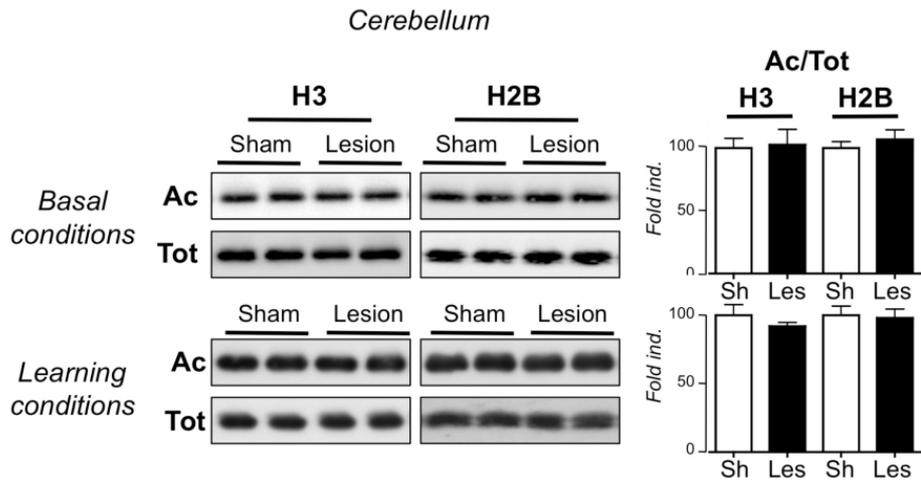


Figure S6

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.

Discussion

Nos travaux mettent en évidence trois points majeurs au niveau des mécanismes épigénétiques impliqués dans la consolidation de la mémoire spatiale.

Tout d'abord, nous avons montré une augmentation de la transcription des HATs *CBP*, *p300* et *PCAF*, associée à une augmentation de l'activité HAT globale, dans l'hippocampe dorsal de Rat, lors la consolidation de la mémoire (1h après le 3^e jour d'apprentissage en MWM). Cette augmentation de la transcription des HATs se reflète par une augmentation des niveaux de protéines, même si la significativité n'est atteinte que pour *CBP*. Ceci suggère donc un rôle de ces enzymes, et plus particulièrement de *CBP*, dans la régulation des programmes génétiques qui se mettent en place pendant la consolidation de la trace spatiale.

Par ailleurs, nous avons observé une régulation différentielle de l'acétylation des histones dans l'hippocampe dorsal. En effet, nous avons montré pour la première fois une augmentation globale de l'acétylation des histones H2B et H4 en réponse à un apprentissage spatial. Cette hyperacétylation se traduit au niveau fonctionnel par l'activation de la transcription de gènes précoces impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire comme *zif268* et le *bdnf-IV*. Une augmentation de l'acétylation de H3 a également pu être observée, mais celle-ci semble plutôt être induite par le contexte expérimental.

Enfin, nous avons pu appuyer l'importance de la voie *CBP*/acétylation des histones grâce à un modèle lésionnel présentant des déficits de mémoire de type déclaratif et modélisant ainsi certains aspects de l'amnésie antérograde décrite chez des patients Alzheimer (Cassel et coll., 2008). En effet, les déficits mnésiques sont corrélés à une diminution de l'expression de *CBP* associée à une hypoacétylation des histones, ce qui se traduit *in fine* par une diminution de la transcription des gènes précoces précédemment cités.

Bien que ce dernier point confirme l'intervention des mécanismes d'acétylation des histones dans la consolidation de la mémoire spatiale, nous allons développer plus particulièrement les deux premiers points de discussion qui constituent un pré-requis essentiel avant d'aborder ces mécanismes chez le Rat âgé (article 2).

1. La consolidation de la mémoire spatiale entraîne une augmentation de l'expression de certaines HATs et de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal.

L'importance de l'activité HAT, et notamment celle de CBP, dans la formation de la mémoire à long terme est largement documentée. Lorsque l'on interfère avec les enzymes permettant l'acétylation des histones *via* des modèles transgéniques, on observe alors des modifications des niveaux d'acétylation des histones, associées à des troubles de la mémoire (Chen et coll., 2010 ; Caccamo et coll., 2010 ; Valor et coll., 2011 ; Barrett et coll., 2011 ; pour revues : Barrett et Wood, 2008 ; Gräff et coll., 2011). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés directement aux effets d'un apprentissage sur l'activité HAT et l'acétylation des histones. De manière intéressante, nous avons observé lors de la consolidation de la mémoire spatiale une augmentation de la transcription des HATs *CBP*, *p300* et *PCAF*, associée à une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal. L'activité HAT semble donc contribuer aux processus de consolidation qui se mettent en place suite à un apprentissage spatial. Ces données sont en accord avec les travaux de Korzus et collaborateurs, qui montrent, *via* l'utilisation d'un modèle transgénique qui surexprime CBP mutée au niveau de son domaine HAT (HAT-), que la perte de l'activité HAT de CBP provoque des déficits de la mémoire à long terme. De manière intéressante, ils ont montré que ces déficits peuvent être contrés par un surentraînement (Korzus et coll., 2004). Par conséquent, il est possible que d'autres HATs, comme *p300* et *PCAF*, puissent prendre le relais pour permettre l'apprentissage spatial. Cette hypothèse semble être confirmée par nos résultats. En effet, si l'on s'intéresse par exemple à la liaison de CBP aux promoteurs de deux gènes impliqués dans la plasticité synaptique, à savoir le promoteur-IV du *bdnf* et le promoteur de *zif268*, on n'observe qu'une augmentation modérée de la liaison de CBP au promoteur-IV du *bdnf* et on note une diminution du recrutement de CBP au niveau du promoteur de *zif268*. Pourtant, les promoteurs de ces deux gènes sont fortement enrichis en H2B acétylée, évènement corrélé à une activation de la transcription de ces gènes. Ces résultats suggèrent donc que d'autres HATs ayant H2B comme substrat, comme *p300* et *PCAF* (Roth et coll., 2001 ; Allis et coll., 2007), doivent certainement intervenir pour permettre l'hyperacétylation de H2B que nous avons observée au niveau de ces promoteurs en réponse à l'apprentissage. Différentes études ont d'ailleurs souligné l'implication de *p300* et *PCAF* dans les processus mnésiques. En effet, *p300* et *PCAF* jouent tous deux un rôle dans la formation de la mémoire à long terme (Oliveira et coll., 2007 ; Maurice et coll., 2008 ; Oliveira et coll., 2011).

Ainsi, il y aurait donc une interaction fine entre les différentes HATs, et ce afin d'orchestrer au mieux la régulation de la transcription de gènes nécessaires à la consolidation de la mémoire spatiale.

Si l'on s'intéresse de plus près à *CBP*, nos résultats indiquent que l'apprentissage spatial entraîne une augmentation marquée de l'acétylation de H2B au niveau de son promoteur. De façon plus modérée, le promoteur est aussi enrichi en H4 acétylée. Il est également intéressant de constater que CBP est présent au niveau de son propre promoteur. Ceci suggère donc que les niveaux d'expression de *CBP* sont régulés finement, permettant ainsi le maintien de son expression. Au vue du caractère limitant des niveaux de CBP dans la cellule (Vo et Goodman, 2001), le renforcement de sa disponibilité pourrait alors favoriser son interaction avec divers facteurs de transcription, lui permettant ainsi de contrôler les profils d'expression d'autres gènes cibles nécessaires à la consolidation de la mémoire. Par exemple, le maintien de niveaux élevés de CBP au cours du temps pourrait favoriser une régulation tardive de l'expression de certains gènes, comme le *bdnf*, impliquée dans le stockage à long terme d'un souvenir. En effet, un pic de transcription du *bdnf* est par exemple nécessaire, 12h après un apprentissage dépendant de l'hippocampe, pour maintenir un souvenir à plus long terme (Bekinschtein et coll., 2007).

2. La consolidation de la mémoire spatiale est corrélée à une acétylation différentielle des histones.

Plusieurs études se sont intéressées aux modifications post-traductionnelles des histones, notamment l'acétylation, qui interviennent dans les processus de mémorisation (pour revues : Barrett et Wood, 2008 ; Gräff et coll., 2011). Levenson et collaborateurs, en 2004, ont mis pour la première fois en évidence une régulation dynamique de l'acétylation des histones lors de la formation de la mémoire à long terme. En effet, ils ont montré une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe (CA1) 1h après un apprentissage associatif de type CFC. Cette augmentation est transitoire puisqu'elle n'est plus observée 24h après le conditionnement (Levenson et coll., 2004).

En nous plaçant 1h après le dernier essai (3^e jour d'acquisition en MWM), nous n'avons observé chez les animaux tests (plate-forme cachée : HPf) en comparaison aux animaux contrôles plate-forme visible (VPf) aucun changement au niveau de l'acétylation de H3 et H2A, alors que l'acétylation globale des histones H2B et H4 est augmentée dans l'hippocampe dorsal. Par contre, en comparant les animaux HPf aux animaux contrôles Home Cage (HC), une augmentation de l'acétylation de H3 est observée. Il est cependant intéressant de noter que cette augmentation est présente aussi bien chez les animaux HPf que chez les animaux VPf par rapport aux contrôles HC.

L'hyperacétylation de H3 étant observée à la fois chez les animaux HPf et VPf en comparaison aux animaux HC, elle semble donc plutôt induite suite à l'exposition au contexte expérimental. En effet, les animaux HPf tout comme VPf sont exposés à différents paramètres comme le stress, la nage ainsi qu'à des processus liés à la navigation, et ce dès lors qu'ils sont placés dans la piscine. Il est donc possible que cette augmentation de l'acétylation de H3 favorise alors la transcription de gènes impliqués dans ces processus adaptatifs. L'augmentation de l'acétylation de H3 pourrait aussi conditionner la chromatine en favorisant un premier degré d'ouverture de celle-ci et en permettant ainsi la mise en place d'autres marques épigénétiques plus spécifiques de l'apprentissage (i.e. l'acétylation des histones H2B et H4, voir plus loin dans la discussion), qui activeraient ensuite la transcription des gènes nécessaires aux processus de mémorisation.

Le fait que l'augmentation de l'acétylation de H3 soit uniquement observée chez les animaux HPf et VPf en comparaison aux animaux HC et qu'elle ne soit pas induite par l'apprentissage (même niveau d'acétylation de H3 entre HPf et VPf) n'est pas forcément en contradiction avec les données de Levenson et collaborateurs (2004). Tout d'abord, l'analyse est réalisée au niveau global et on ne peut donc pas exclure une augmentation discrète de l'acétylation de H3 spécifiquement liée à l'apprentissage spatial sur certains promoteurs de gènes. Ensuite, les tests utilisés sont différents et peuvent par conséquent induire la mise en place de processus particuliers, comme par exemple l'activation de cascades intracellulaires spécifiques à chacun de ces tests (pour revue : Mizuno et Giese, 2005). Par ailleurs, Levenson et collaborateurs (2004) ont observé cette hyperacétylation de H3 en comparant le groupe « contexte + choc » à des contrôles HC. Par conséquent, l'augmentation de l'acétylation de H3 observée chez les animaux « contexte + choc » pourrait être due aussi bien à l'apprentissage qu'au contexte expérimental. Il serait donc intéressant d'étudier, dans un test

de CFC, l'acétylation de H3 dans des groupes contrôles placés dans le dispositif expérimental, à savoir des animaux « contexte seul » d'une part, et des animaux « choc » d'autre part (voir article 3).

Dans notre étude, les niveaux d'acétylation de H2B ne varient que chez les animaux HPf, alors qu'ils restent stables chez les animaux VPf et HC. Nos travaux montrent donc pour la première fois que l'augmentation d'acétylation d'H2B est spécifiquement induite en réponse à un apprentissage spatial. Il est intéressant de noter qu'une baisse spécifique (i.e. pas visible sur les autres histones H3, H4 et H2A) de l'acétylation de H2B dans l'hippocampe, associée à des déficits de mémoire à long terme, a également été observée dans des modèles CBP+/- (Alarcon et coll., 2004). Cette diminution a par la suite été confirmée dans différents modèles knock-out conditionnels pour CBP (Valor et coll., 2011 ; Barrett et coll., 2011). D'autres études viennent appuyer l'idée d'un lien entre H2B et mémoire. H2B fait en effet partie des substrats de p300 et PCAF, deux HATs impliquées dans la formation de la mémoire à long terme, alors que cette histone n'est pas reconnue par Tip60 (Roth et coll., 2001 ; Allis et coll., 2007), une HAT dont la transcription ne varie pas en réponse à un apprentissage spatial dans notre étude. Par ailleurs, une étude récente a montré sur des tranches d'hippocampe que l'augmentation de l'acétylation globale de H2B dans CA1 peut également être induite par une dépolarisation (Maharana et coll., 2010), ce qui confirme sa participation aux processus de plasticité synaptique induits par l'activité neuronale. Enfin, on observe chez des souris knock-out pour HDAC2 une amélioration de la mémoire à long terme dans un test de CFC, corrélée à une hyperacétylation spécifique des histones H2B et H4 au niveau basal dans l'hippocampe (aucune modification au niveau de l'acétylation des histones H3 et H2A n'a été observée) (Guan et coll., 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle transgénique qui entraîne une inhibition du suppresseur de mémoire pp1 (protéine phosphatase 1), dans lequel on note une amélioration de la mémoire à long terme en MWM, associée à une augmentation préférentielle de l'acétylation des histones H2B et H4 au niveau basal dans l'hippocampe (Koshibu et coll., 2009), ce qui souligne à nouveau le lien entre l'augmentation de l'acétylation de H2B et les processus de plasticité synaptique et de mémoire.

Nos résultats, tout comme ceux de Guan et collaborateurs et ceux de Koshibu et collaborateurs semblent cependant montrer que H2B n'est pas la seule histone impliquée dans les processus mnésiques. En effet, une augmentation de l'acétylation de H4 est également

observée chez les animaux HPf en comparaison aux animaux VPf, ce qui suggère donc que H4, tout comme H2B, serait spécifiquement hyperacétylée en réponse à l'apprentissage spatial (voir article 3). Ceci est en accord avec les données obtenues dans une étude récente qui montre une augmentation globale des acétylations de H4 dans l'hippocampe de souris 1h après un CFC (Peleg et coll., 2010). Le lien entre acétylation de H4 et mémoire est également renforcé par le fait que dans un modèle transgénique knock-out conditionnel pour HDAC3 dans l'hippocampe dorsal (CA1), on observe une amélioration des capacités de mémoire à long terme dans un test de reconnaissance d'objets, associée à la fois à une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 au niveau de la lysine 8 (H4K8) et à une augmentation de l'expression de certains IEGs comme *c-fos* (McQuown et coll., 2011).

Dans l'ensemble, ces données témoignent donc de la dynamique de l'acétylation des histones H2B et H4 lors de la consolidation de la mémoire spatiale. Notre étude renforce l'idée que des marques épigénétiques bien précises se mettent en place suite à l'apprentissage, et participent ainsi à la consolidation des souvenirs. Le fait que l'augmentation de l'acétylation des histones H2B et H4 soit détectable au niveau global suggère que l'apprentissage spatial conduit à une réorganisation significative de la structure de la chromatine, permettant certainement la régulation de nombreux gènes.

3. L'acétylation différentielle des histones est observée au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire.

Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent qu'au niveau fonctionnel, les acétylations de H2B et H4 participent à la transcription de gènes impliqués dans la plasticité synaptique et la mémoire. En effet, on note chez les animaux HPf d'une part un enrichissement en H2B acétylée au niveau des promoteurs de gènes précoces comme *zif268* (*Egr1*), *c-fos*, *FosB* ainsi que le promoteur IV du *bdnf*, et d'autre part un enrichissement en H4 acétylée au niveau des promoteurs de *zif268* et *c-fos*. Cette augmentation de l'acétylation des histones H2B et H4 au niveau des promoteurs des gènes précédemment cités est associée à l'activation de leur transcription pendant la consolidation de la mémoire spatiale.

Concernant le *bdnf*, de nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de sa transcription dans l'hippocampe en réponse à différents types d'apprentissages dépendants de l'hippocampe (pour revues : Yamada et Nabeshima, 2003 ; Lu et coll., 2008).

Par ailleurs, des études *in vitro*, mais également *in vivo* soulignent que cette transcription du *bdnf* met en jeu une régulation précise et différentielle de ses transcrits et que celle-ci est régulée, au moins en partie, par des modifications épigénétiques, et notamment les modifications post-traductionnelles des histones (Tian et coll., 2009 ; Levenson et coll., 2006 ; Bredy et coll., 2007 ; Lubin et coll., 2008 ; Gupta et coll., 2010). Par exemple, la transcription du *bdnf* contenant les exons I et IV (*bdnf-I, -IV*) est préférentiellement activée en réponse à une dépolarisation neuronale *in vitro*, et cette transcription fait intervenir des modifications épigénétiques comme une diminution de la méthylation de l'ADN ou une hyperacétylation des histones au niveau de ces promoteurs (Chen et coll., 2003 ; Martinowich et coll., 2003 ; Tian et coll., 2009 ; Tian et coll., 2010). *In vivo*, différentes études ont observé une régulation exon-spécifique des transcrits du *bdnf* en réponse à un CFC. Des études ont en effet montré une augmentation sélective des transcrits I et IV du *bdnf* dans l'amygdale (structure impliquée dans les circuits de peur) mais aucun changement au niveau des transcrits II et VI (Rattiner et coll., 2004 ; Ou et Gean, 2007). Plus récemment, Lubin et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation spécifique de la transcription du *bdnf-IV* dans l'hippocampe en réponse au CFC, associée à une hyperacétylation des histones sur ce promoteur (Lubin et coll., 2008). Jusqu'à présent, les études qui se sont focalisées sur la régulation de l'expression exon-spécifique du *bdnf* par des modifications épigénétiques en réponse à un apprentissage (*bdnf-IV*) se sont placées exclusivement dans un test de CFC. Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que cette augmentation marquée de la transcription du *bdnf-IV*, associée à une hyperacétylation de H2B sur son promoteur, peut également être induite par un apprentissage en MWM et suggèrent donc qu'elle pourrait être associée à un phénomène plus général de consolidation de la mémoire.

Pour résumer, nous avons montré une augmentation de l'expression des HATs CBP, p300 et PCAF, associée à une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal pendant la consolidation synaptique de la mémoire spatiale. Ceci induit une augmentation des acétylations de certaines histones, comme H2B et H4, détectable au niveau d'analyse globale des homogénats hippocampiques et au niveau plus spécifique de certains promoteurs. L'augmentation de l'acétylation des histones H2B et H4 est notamment observée au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire, comme le *bdnf* par exemple, ce qui est corrélé à une activation de leur transcription.

En conclusion, cette étude nous a donc permis d'identifier des marqueurs épigénétiques impliqués dans la consolidation de la mémoire (spatiale) chez le Rat jeune adulte. L'identification de ces marqueurs constitue un pré-requis essentiel dans le but d'étudier ces mécanismes chez le Rat âgé (article 2).

ARTICLE 2

Late Environmental Enrichment Housing Conditions are Associated with Increased Histone Acetyltransferase Activity and Acetylated Chromatin Structure at Specific Enhancers in Brain-Derived Neurotrophic Factor Promoter I in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Memory

Romain Neidl, Monique Majchrzak, Alexandra Barbelivien, Anne Pereira de Vasconcelos, Olivier Bousiges, Jean-Philippe Loeffler, Jean-Christophe Cassel et Anne-Laurence Boutillier

En préparation pour *PNAS*

Contexte scientifique et objectifs

Le vieillissement normal s'accompagne d'un déclin progressif des capacités mnésiques, et notamment des capacités de mémoire spatiale (Gallagher et Burwell, 1989). Ce déclin est corrélé à des déficits de plasticité hippocampique, aussi bien au niveau des processus de plasticité synaptique que de neurogénèse, associés à une dérégulation de la transcription de gènes impliqués dans ces processus (Blalock et coll., 2003 ; Burger et coll., 2008).

La transcription des gènes est un mécanisme finement régulé, à la fois par l'intervention de facteurs de transcription spécifiques et par la mise en jeu de modifications épigénétiques. Ces dernières induisent en effet des changements au niveau de la structure de la chromatine, favorable ou non, selon le type de modifications épigénétiques, à l'activation de la transcription. Les HATs participent à ces changements de conformation de la chromatine en entraînant l'acétylation des histones au niveau des promoteurs de gènes, ce qui favorise alors l'activation de leur transcription. Il est maintenant bien établi que ces mécanismes d'acétylation des histones sont impliqués, entre autres, dans les processus de plasticité et de mémoire (pour revue : Gräff et coll., 2011). Dans une étude chez le Rat jeune adulte, nous avons par exemple mis en évidence une augmentation globale de l'activité HAT dans l'hippocampe dorsal, en réponse à un apprentissage spatial. Cette augmentation de l'activité HAT est associée à une augmentation de l'acétylation de certaines histones et se répercute sur l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans les phénomènes de plasticité et de mémoire comme le *bdnf* par exemple (Bousiges et coll., 2010). De manière intéressante, une étude récente de Fischer et collaborateurs a montré qu'une altération des mécanismes d'acétylation des histones est observée, dans l'hippocampe, lors du vieillissement et que celle-ci participe à la dérégulation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire, contribuant ainsi au déclin mnésique lié à l'âge (Peleg et coll., 2010).

Un des moyens utilisés pour contrer l'apparition des déficits mnésiques lors du vieillissement est l'exposition à un EE (Bennett et coll., 2006 ; Harati et coll., 2009). En effet, l'EE, même débuté tardivement dans la vie de l'animal, permet de préserver les capacités de mémoire spatiale chez le Rongeur âgé (Frick et Fernandez, 2003 ; Harburger et coll., 2007),

en favorisant notamment certains processus de plasticité hippocampique *via* l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques (pour revue : Nithianantharajah et Hannan, 2006). Une étude récente menée chez le rongeur jeune adulte a par ailleurs montré que les effets bénéfiques de l'EE sur les capacités mnésiques pouvaient en partie s'expliquer par une augmentation globale de l'acétylation des histones dans l'hippocampe (Fischer et coll., 2007).

Le *bdnf* est un exemple de gènes impliqués dans les processus de plasticité hippocampique et de mémoire. En effet, l'implication de cette neurotrophine a été largement démontrée, que ce soit dans les processus de plasticité synaptique, dans la neurogénèse ou encore dans l'apprentissage et la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe (Braham et Messaoudi, 2005 ; Lu et coll., 2008 ; Bekinschtein et coll., 2008 (b)). Il est intéressant de noter que l'EE induit une activation de la transcription du *bdnf*. En effet, les niveaux protéiques du BDNF sont augmentés dans l'hippocampe suite à une exposition à un EE, ce qui est corrélé à l'amélioration des capacités d'apprentissage spatial observée suite à l'enrichissement (Ickes et coll., 2000).

Il est cependant important de préciser que la transcription du *bdnf* est un mécanisme complexe. On retrouve au moins 8 promoteurs, tous régulés de manière différentielle, générant ainsi plusieurs transcrits qui codent tous pour le BDNF (Aid et coll., 2007). De manière intéressante, certains de ces transcrits sont exprimés spécifiquement en réponse à un apprentissage dépendant de l'hippocampe, comme le CFC ou le MWM, et l'activation de leur transcription est notamment régulée par des modifications épigénétiques telles que l'acétylation des histones (Lubin et coll., 2008 ; Bousiges et coll., 2010).

L'objectif de ce travail est (1) de voir si l'exposition à un EE tardif améliore les capacités mnésiques (spatiales) chez le Rat âgé et (2) si oui, d'étudier l'implication potentielle des mécanismes d'acétylation des histones, normalement perturbés au cours du vieillissement (Peleg et coll., 2010). Dans ce but, nous avons exposé les rats à l'EE à partir de 18 mois, âge auquel les rats présentent déjà les premiers déficits mnésiques. Afin de favoriser l'effet bénéfique de l'EE sur les capacités mnésiques (spatiales), l'enrichissement a été mené sur une période de 6 mois (de 18 à 24 mois).

Les mécanismes d'acétylation des histones ont été étudiés dans l'hippocampe dorsal car il est établi que cette sous-région de l'hippocampe est particulièrement impliquée dans la mémoire spatiale (Fanselow et Dong, 2010). Nous avons comparé des rats âgés (24 mois) élevés en environnement enrichi (aEE) à des rats du même âge élevés en conditions standard (aSTD). Ces groupes ont été analysés à la fois en conditions basales (groupes *Home Cage*) et dans un contexte d'apprentissage (groupes *Learning*).

Nous avons tout d'abord évalué les profils d'expression de certaines HATs impliquées dans la consolidation de la mémoire spatiale, comme CBP, p300 et PCAF (Bousiges et coll., 2010). Nous avons également mesuré l'activité HAT globale ainsi que les niveaux d'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe dorsal des rats âgés. Nous avons ensuite évalué l'impact fonctionnel de ces mécanismes d'acétylation sur l'expression d'un gène impliqué dans les processus de plasticité et de mémoire, le *bdnf* (étude du *bdnf* total), et nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'expression de certains de ses transcrits (*bdnf-I*, *bdnf-IV* et *bdnf-VI*).

Afin de compléter notre étude sur la compréhension des mécanismes sous-tendant l'activation transcriptionnelle de ce gène, nous avons évalué l'impact de l'EE sur l'activité des facteurs de transcription CREB et NF- κ B, tous deux étant d'une part impliqués dans les processus mnésiques (Sakamoto et coll., 2011 ; Kaltschmidt et Kaltschmidt, 2009), et d'autre part, capables d'activer la transcription du *bdnf* dans les neurones (Marini et coll., 2004 ; Tabuchi, 2008).

Matériel et Méthodes

Animaux et conditions d'élevage

200 Rats Long-Evans (femelles) (Centre d'Élevage René Janvier, Le Genest-St-Isle, France) ont été utilisés. Arrivés à l'âge de 4 semaines au laboratoire, ils sont placés dans des conditions classiques d'élevage (4-5 par cage) jusqu'à l'âge de 18 mois. A partir de cet âge, ils sont placés de manière aléatoire dans une des deux conditions d'élevage pendant une période de 6 mois. Des rats jeunes adultes placés à l'âge de 4 semaines pendant 6 mois en conditions standard d'élevage (voir conditions plus bas) servent de groupe contrôle. Les rats âgés standards (STD) non enrichis sont placés par paire dans des cages transparentes Makrolon (46cm x 26cm x 15cm). Les rats âgés enrichis (EE) sont élevés par groupe de 10-12 dans deux cages *wire-mesh* (112cm x 40cm x 40cm) connectées par deux ouvertures, contenant différents objets (tunnels, jouets, etc.) changés cinq fois par semaine. La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum* dans les deux conditions d'élevage mais dans la condition enrichie, leur emplacement est modifié au moment où les objets sont changés. Pour les deux conditions d'élevage, les cages sont placées dans une pièce contrôlée en température ($22\pm 1^\circ\text{C}$) et en humidité ($55\pm 5\%$), qui présente un cycle lumière-obscurité 12h-12h (début du cycle lumière à 8h). Après la période d'élevage différentiel (6 mois), les rats (âgés de 24 mois), mais également les rats jeunes adultes (7 mois) sont placés individuellement dans des cages transparentes Makrolon (46cm x 26cm x 15cm) pendant les 2 semaines qui précèdent le début des tests comportementaux.

L'étude est conforme aux législations de la Directive Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et du Département Français de l'Agriculture (autorisation n°67-215 pour JCC).

Evaluation de la mémoire spatiale en Piscine de Morris

La mémoire spatiale a été évaluée dans le MWM, dans un protocole de mémoire de référence. Le MWM consiste en un bassin circulaire (160cm de diamètre, 60cm de hauteur) rempli d'eau sur une hauteur de 30cm. L'eau, maintenue à 20°C , est rendue opaque par ajout de lait en poudre. Le bassin se trouve dans une pièce contenant différents indices distaux (chaise, ordinateur, lumières, formes géométriques peintes sur les murs, etc). Le bassin est

virtuellement divisé en quatre quadrants égaux. Une plate-forme de 11cm de diamètre est immergée dans le bassin, 1cm en-dessous du niveau de l'eau. La position de la plate-forme dans le bassin reste fixe durant la totalité de la phase d'acquisition (phase d'apprentissage). La phase d'acquisition dure 5 jours, au cours desquels les rats sont placés dans le dispositif à raison de 4 essais consécutifs par jour. A chaque essai, le rat est placé dans le bassin, face à la paroi. Les points de lâcher varient de manière aléatoire d'un essai à l'autre. Un essai dure au maximum 60 secondes. Si le rat trouve la plate-forme en moins de 60s et qu'il grimpe dessus, il y est laissé pendant 10s puis récupéré pour débiter l'essai suivant. S'il ne trouve pas la plate-forme au bout du temps imparti (60s), il est alors guidé par l'expérimentateur vers la plate-forme, laissé 10s dessus puis récupéré pour débiter l'essai suivant. Les données sont enregistrées à l'aide d'un système d'enregistrement vidéo (Noldus, The Netherlands) et les paramètres évalués sont : la distance parcourue pour atteindre la plate-forme, le pourcentage de thigmotaxie (la thigmotaxie correspond au temps passé par les animaux en bordures de bassin (<10cm des murs du bassin) ; % de thigmotaxie [(temps passé en périphérie/latence totale pour atteindre la plate-forme) x100]) et la vitesse moyenne. La latence d'accès à la plate-forme a également été mesurée. Cependant, elle n'est pas présentée car elle est généralement considérée comme plus sensible que la variable distance aux biais non cognitifs liés à l'âge, comme les biais sensori-moteurs ou les biais liés à la motivation (Lindner, 1997). Le lendemain du dernier jour d'acquisition, la plate-forme est retirée et les rats effectuent un test de rétention de 60s. Différents paramètres sont alors évalués : le temps passé dans le quadrant cible (quadrant dans lequel la plate-forme était localisée lors de l'acquisition), le nombre de fois où l'animal traverse l'annulus (zone virtuelle où était localisée la plate-forme lors de l'acquisition, élargie de 10cm) (*annulus crossings*) et la distance moyenne à l'annulus. Les deux jours suivant le test de rétention, les rats réalisent une version du test, dans laquelle la plate-forme est visible, et ce afin d'évaluer d'éventuels biais sensori-moteurs ou motivationnels liés à l'âge. Nous avons alors analysé la distance parcourue par les animaux pour rejoindre la plate-forme.

Concernant les rats utilisés pour les analyses moléculaires, le protocole a été modifié pour se placer dans les conditions expérimentales de Bousiges et coll. (2010). Les animaux ont d'abord été soumis à 2 jours de plate-forme visible, puis à 3 jours d'acquisition à raison de 4 essais consécutifs par jour (Bousiges et coll., 2010). Une heure après le 3^e jour d'acquisition, un test de rétention est réalisé afin d'évaluer les performances de rappel des animaux.

Analyses statistiques (analyse comportementale)

Les paramètres enregistrés durant l'acquisition ont été analysés par une ANOVA à mesure répétée à deux facteurs (two-way ANOVA), les facteurs 'jours' (1 à 3 ou 1 à 5) et 'âge' ou 'conditions d'élevage'. Les performances du test de rétention ont été analysées par une ANOVA à un facteur (one-way ANOVA) afin de comparer entre les différents groupes, le nombre de traversées de l'annulus ainsi que les distances moyennes à l'annulus. Lorsque cela est approprié, les comparaisons post-hoc ont été analysées avec un test de Newman-Keuls. Un t-test a été réalisé afin de comparer le temps passé dans le quadrant cible au hasard (15s). Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme significatives.

Préparation des tissus

Les animaux sont décapités et leur cerveau rapidement prélevé puis transféré sur glace. Pour les rats passés en comportement (groupes condition d'apprentissage), l'euthanasie a lieu directement après le test de rétention, soit 1h après la fin du 3^e jour d'acquisition. Les tissus sont immédiatement disséqués et soit congelés à -80°C jusqu'aux études moléculaires (ARN, protéine) soit immédiatement traités (extractions nucléaires et chromatines).

Extraction des ARN et PCR quantitative (RT-qPCR)

Les ARN totaux sont extraits à partir de l'hippocampe dorsal en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les échantillons sont homogénéisés dans un *Tissue Lyser* (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARN sont précipités deux fois à l'éthanol. Seuls les échantillons présentant des ratios de densités optiques 260/280 et 260/230 proches de 2.0 sont utilisés pour la transcription inverse (RT) (n=7-10 par groupe). Les échantillons d'ARN sont dénaturés 10min à 70°C et la synthèse d'ADNc est faite à partir de 1 μg d'ARN (iScript cDNA synthesis kit ; Bio-Rad, Marne La Coquette, France). Les analyses de PCR quantitative sont effectuées avec le système *Bio-Rad iCycler System* qui utilise l'*iQSYBR Green Supermix*. Pour chaque gène, une courbe standard spécifique est effectuée en parallèle et tous les échantillons sont quantifiés en duplicat. Les conditions de PCR sont 3min à 94°C , suivies de 40 cycles : 45s à 94°C et 10s à $58-62^{\circ}\text{C}$. Les données sont analysées avec le logiciel *iCycler*,

et normalisées à l'ARN polymérase II. Les séquences des oligonucléotides utilisés sont disponibles dans le tableau 1.

Préparation des protéines et analyses par western blot

Préparation des protéines totales. Les tissus sont lysés et homogénéisés dans le tampon Leampli. Les échantillons sont soniqués pendant 10s (Ultrasonic Processor, puissance 60%), bouillis 5min à 90°C puis centrifugés (5min, 20 000g). Le supernageant est alors congelé (-20°C).

Extraction de protéines nucléaires (Protocole adapté de Dignam et coll, 1983). Brièvement, le protocole est suivi jusqu'à l'étape de récupération du culot nucléaire dans le tampon C, supplémenté avec du PIC (*protease inhibitor cocktail*) et du butyrate de sodium (1mM). La solution est ensuite homogénéisée délicatement avec un *dounce homogenizer*, puis centrifugée. La fraction nucléaire soluble est alors rapidement congelée et stockée à -80°C. Le DTT n'est pas rajouté, afin de préserver les activités HAT des échantillons.

Analyse par western blot. Les concentrations protéiques sont mesurées en utilisant le kit *RC-DC protein Assay* (Bio-Rad). Les western blot sont effectués comme décrit précédemment (Rouaux et coll., 2007), en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre CBP (sc-369) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), la forme acétylée de l'histone H3 (06-599), l'histone H3 (ab1791), p65 (ab31481) (Abcam, Cambridge, UK), l'actine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), CREB1 (AB3068) (Chemicon), la forme phosphorylée de p65 (5536) (Cell Signaling) et des anticorps monoclonaux dirigés contre la forme phosphorylée de CREB (Upstate Biotechnology, New-York, NY, USA) PCAF (3378) (Cell Signaling) et la GFAP (MAB360, Upstate Biotechnology). Les anticorps secondaires respectivement utilisés pour les anticorps polyclonaux et monoclonaux, anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris, sont couplés à la *horseradish peroxidase* (Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK). La révélation s'effectue avec de l'ECL (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Les résultats sont quantifiés avec le logiciel ImageJ.

Activité HAT

L'activité HAT est mesurée au niveau des extraits de protéines nucléaires selon les instructions du kit *HAT Assay kit (fluorescent)* (Active Motif, North America). Tous les échantillons sont testés en duplicat. L'activité est analysée dans un lecteur de plaques à fluorescence, aux longueurs d'onde d'excitation 360-390 nm et d'émission 450-470 nm.

Immunoprécipitation de la chromatine

Préparation de la chromatine. Après décapitation, les tissus frais sont dissociés au scalpel et rapidement transférés dans 5mL de PBS contenant 1% de formaldéhyde pendant 10min à température ambiante. L'étape de fixation est interrompue par l'ajout de glycine (à une concentration finale de 0.125M). Les échantillons sont préparés comme décrit précédemment dans Panteleeva et coll (2007), puis congelés immédiatement dans l'azote liquide et stockés (-80°C).

Immunoprécipitation (IP). Une quantité égale (120µg) de complexe ADN/protéines est utilisée dans un volume de 500µL de tampon de dilution ChIP (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-Cl, pH 8.1, 167mM NaCl). Une fraction du surnageant (20µL) de chaque échantillon, prélevée avant l'IP, sert d'Input (quantité totale de chromatine avant l'IP). Le reste du surnageant est incubé toute la nuit à 4°C avec 2µg d'anticorps primaire reconnaissant H3 acétylée (06-599, Upstate Biotechnology) ou sans anticorps (contrôle négatif). Cette étape est suivie d'une incubation avec un mélange de protéines A/G *Dynabeads* (Invitrogen) pendant 2h. Après plusieurs étapes de lavage (tampons low salt, high salt, LiCl puis TE), les complexes sont élués dans 200µL de tampon d'éluion (1% SDS, 0.1% NaHCO₃). Les complexes sont dissociés toute la nuit à 65°C et l'ADN est ensuite purifié lors des étapes de RNase (30min, 37°C), de protéinase K (2h, 45°C), puis d'extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Après le dernier lavage à l'éthanol 70%, les culots sont resuspendus dans 50µL d'H₂O ultrapure.

Amplification par PCR. Les amplifications s'effectuent par PCR semi-quantitative dans le système *MyCycler* de Bio-Rad (95°C 4min, et 95°C 40s ; 58-62°C 40s ; 72°C pendant 40s pour 30-36 cycles). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont disponibles dans le tableau 1.

Immunohistochimie

Les rats sont profondément anesthésiés au pentobarbital (IP 200mg/kg) et perfusés au paraformaldéhyde 4% (PFA). Après décapitation des animaux, le cerveau est post-fixé (PFA 4%) pendant 2h. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés dans du sucrose 20% pendant 24h, puis congelés dans de l'isopentane à -40°C et conservés au -80°C. Les cerveaux sont coupés au cryostat, à une épaisseur de 50µm. Les coupes flottantes sont gardées à -20°C dans un liquide de cryoprotection jusqu'à leur utilisation. Les peroxydases endogènes sont inactivées avec de l'H₂O₂ 1% / PBS 1X pendant 10min. La perméabilisation est effectuée avec du PBS 1X / Triton 2% pendant 15min. Les sites antigéniques sont bloqués avec une solution de PBS 1X / Triton 0.1% / Sérum de Cheval 5% pendant 30min à 37°C. Les coupes sont incubées toute la nuit avec un anticorps polyclonal reconnaissant la doublecortine (DCX) (sc-8066) dans du PBS 1X / Triton 0.1% / Sérum de cheval 5%. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps *anti-goat* biotinylé (Chemicon AP180B) dans du PBS 1X / Triton 0.1% pendant 1h. Après 3 rinçages au PBS 1X / Triton 0.1%, la révélation s'effectue avec la diaminobenzidine (DAB 0.05%, Tris 0.04M pH7.5, H₂O₂ 0.03%). La réaction est interrompue avec du PBS 1X et les coupes sont lavées à l'eau. Les coupes sont montées sur lame avec du *diamount* (DiaPath, Italie) puis séchées.

Analyses statistiques (analyses moléculaires)

Les résultats ont été analysés en utilisant le test de Student (t-test) (PRISM version 4.0b ; GraphPad, San Diego, CA, USA). Les données sont exprimées dans un format moyenne±SEM. Les valeurs de p<0.05 sont considérées comme significatives.

Tableau 1 : Séquences des oligonucléotides utilisés

	Gene	Sequences
mRNA quantification	Bdnf-total	L : 5'-GCC-AGC-CAA-TTC-TCT-TTT-TG-3'
		R : 5'-AAT-CCC-ATG-GGT-TAC-ACG-AA-3'
	Bdnf-I	L : 5'-GCG-TTG-AGA-AAG-CTG-CTT-CAG-3'
		R : 5'-GAA-TGA-GCG-AGG-TTA-CCA-ATG-AC-3'
	Bdnf-IV	L : 5'-GAG-CAG-CTG-CCT-TGA-TGT-TT-3'
		R : 5'-GTG-GAC-GTT-TGC-TTC-TTT-CA-3'
	Bdnf-VI	L : 5'-TCA-CGT-GCT-CAA-AAG-TGT-CAG-3'
		R : 5'-TTG-GGG-CAG-ACG-AGA-AAG-CGC-3'
	CBP	L : 5'-AAG-AAT-ATG-GCT-CCG-ATT-GC-3'
		R : 5'-TGA-GGA-TCT-CAT-GGT-AAA-CAG-C-3'
	P300	R : 5'-GGA-TCT-TCG-AAA-CCA-CCT-TG-3'
		L : 5'-TTC-CAT-CCG-TCG-GTC-TTT-TA-3'
	PCAF	L : 5'-GCT-TTA-CAG-CAC-GCT-CAA-GA-3'
		R : 5'-GTT-CCA-TGA-AGG-GCC-AAG-3'
	Myst4	L : 5'-CCA-CAG-TAC-AGG-GTC-AAT-ACT-GG-3'
		R : 5'-GCT-ACA-TAT-TGG-AAT-GGG-ATC-G-3'
	GFAP	L : 5'-TTC-CTC-CAA-CCT-CCA-GAT-CC-3'
		R : 5'-GAG-GTG-GCC-TTC-TGA-CAC-AG-3'
β3 tubulin	L : 5'-GTG-CCC-TGA-AGA-GCT-GGT-AG-3'	
	R : 5'-GAG-GAG-GAG-GGG-GAG-ATG-TA-3'	
RNA PolIII	L : 5'-TTC-GGC-TCA-GTG-GAG-AGG-3'	
	R : 5'-GCT-CCC-ACC-ATT-TCT-CCA-G-3'	

ChIP	Bdnf-I NRSE	L:5'-CCA-AAG-CCC-ACC-TTC-TGG-AGC-T-3'
		R:5'-GCC-CTA-GAT-CTC-TGA-GCG-AAG-AGG-TAT-A-3'
	Bdnf-I CRE	L: 5'-AAC-TTT-TCT-AAG-AAG-TTT-CCT-TTT-TAC-CA-3'
		R : 5'-TGA-GCC-AGT-TAC-GTG-ACC-AAC-T-3'
	Bdnf-I NF-κB1	L : 5'-GCA-GTT-GGA-CAG-TCA-TTG-GTA-ACC-3'
		R : 5'-ACG-CAA-ACG-CCC-TCA-TTC-TG-3'
	Bdnf-I NF-κB2	L : 5'-ATT-TGT-ATG-GGG-GTA-CTC-TGA-AAC-TC-3'
		R : 5'-AGC-TTT-CTC-AAC-GCC-TGT-CAC-T-3'
	Gapdh	L : 5'-CCG-ACC-TTC-ACC-ATC-TTG-TC-3'
		R : 5'-CTG-GCC-ACG-CTA-ATC-TGA-CT-3'
	TSH2B	L : 5'-AAG-GGT-TCA-AGA-AAG-CAG-TCA-C-3'
		R : 5'-CTC-CTT-GCG-GCA-TCT-CTT-AC-3'

Résultats

1. Evaluation de la mémoire spatiale de référence chez le Rat âgé de 24 mois après une exposition de 6 mois à un environnement enrichi

Il est largement décrit dans la littérature qu'une exposition à un EE exerce un effet bénéfique sur les capacités mnésiques d'un animal (pour revue : Nithianantharajah et Hannan, 2006). Dans notre étude, nous avons voulu voir si l'EE peut encore exercer un effet bénéfique chez le Rat âgé de 18 mois, alors qu'il présente déjà des déficits mnésiques. Nous avons évalué la mémoire spatiale de référence dans le MWM dans 3 groupes de rats : des rats adultes (7 mois) élevés dans des conditions classiques d'élevage (4-5 animaux par cage : ySTD) et des rats âgés élevés dans ces mêmes conditions jusqu'à l'âge de 18 mois, puis exposés pendant 6 mois soit à un environnement standard (2 animaux par cage : aSTD), soit à un EE (voir partie matériel et méthodes : aEE) (figure 1(A)).

Le principe du MWM se base sur l'aversion du Rat pour l'eau fraîche. Dans un protocole de mémoire de référence, les animaux doivent apprendre la localisation d'une plate-forme 'échappatoire/refuge' immergée 1cm en-dessous du niveau de l'eau rendue opaque avec du lait, et ce en utilisant les indices visuels présents dans la pièce. Cette plate-forme immergée est toujours placée au même endroit. Les rats sont entraînés durant 5 jours consécutifs à raison de 4 essais par jour, chaque essai débutant d'un point de lâcher différent. Nous avons évalué la distance parcourue par les rats avant d'atteindre la plate-forme. Pour les 3 groupes d'animaux, la distance moyenne diminue au cours des 5 jours d'apprentissage (figure 1(B)). Cependant, les deux groupes de rats âgés, et plus particulièrement les rats âgés élevés en conditions standard (aSTD), parcourent une distance plus importante avant d'atteindre la plate-forme en comparaison au groupe de rats jeunes adultes (ySTD). En effet, le test ANOVA indique un effet 'groupe' ($F_{2/29}=7.99$, $p<0.01$) et un effet 'jours' ($F_{4/116}=23.98$, $p<0.001$) significatifs mais pas d'effet de l'interaction entre ces deux facteurs ($F_{8/116}=1.42$). Les comparaisons post-hoc indiquent une baisse globale de la distance parcourue chez les rats jeunes adultes (ySTD) comparés d'une part aux rats âgés élevés en conditions standard (aSTD) ($p<0.001$) et d'autre part, aux rats âgés élevés en conditions enrichies (aEE) ($p<0.01$). Par contre, nous n'avons observé aucune différence significative

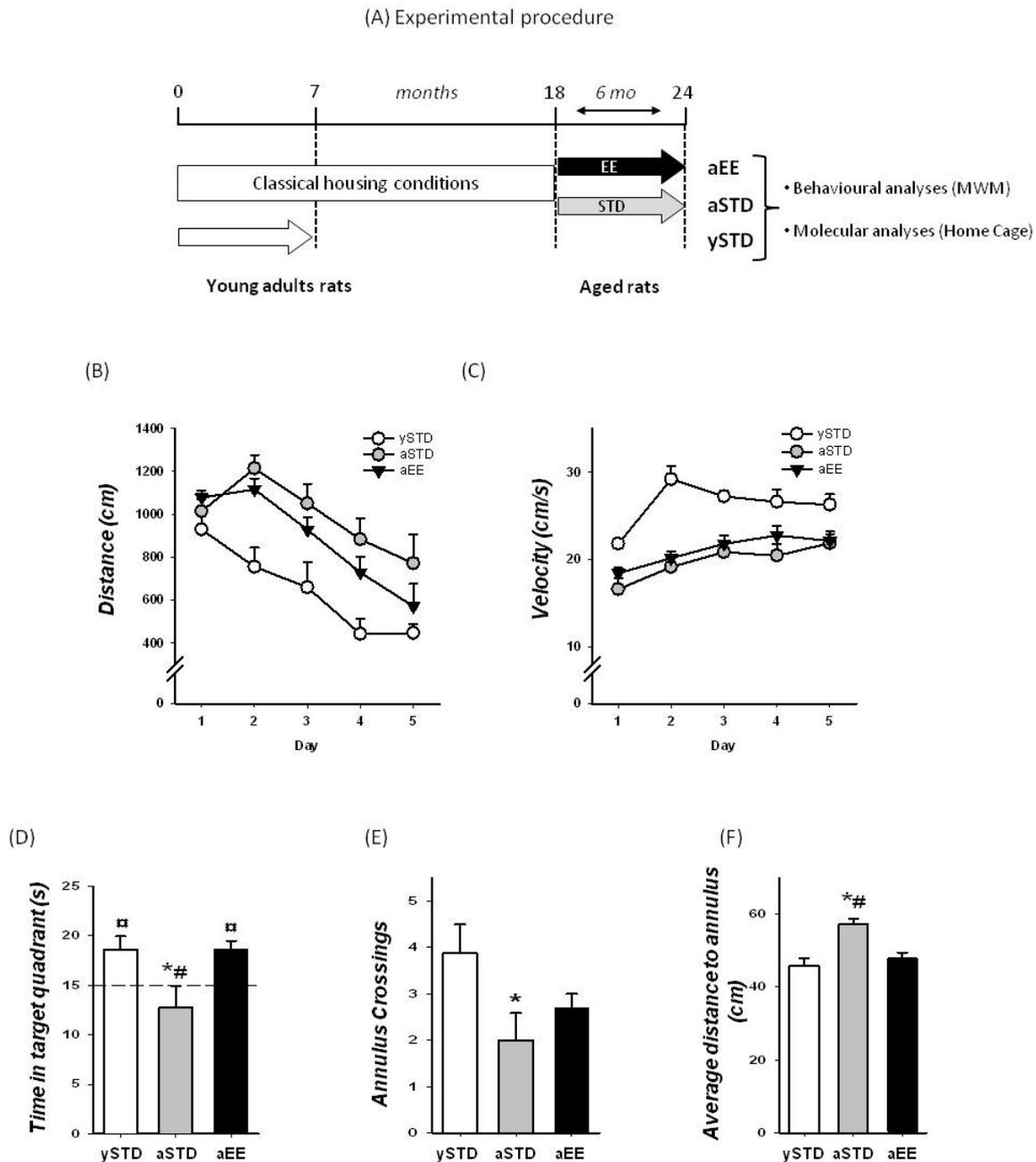


Figure 1. Evaluation de la mémoire spatiale de référence en MWM chez les rats jeunes adultes élevés en conditions classiques de laboratoire (ySTD (n=9-10)) et chez les rats âgés élevés soit en conditions standard, soit en EE les 6 derniers mois de leur vie (aSTD (n=9-10) et aEE (n=15-16)). (A) Procédure expérimentale et formation des groupes. (B) Distance (cm) moyenne parcourue (\pm SEM) pour rejoindre la plate-forme au cours des 5 jours d'apprentissage. (C) Vitesse (cm/s) moyenne de nage (\pm SEM) au cours des 5 jours d'apprentissage. (D) Durée (s) moyenne de nage dans le quadrant cible (\pm SEM) lors du test de rétention effectué 24h après la fin de l'apprentissage (t-test : $\#p < 0.05$, significativement différent du hasard (15s) ; ySTD vs aSTD, aEE vs aSTD * $p < 0.05$). (E, F) Analyse des paramètres de précision lors du test de rétention : nombre d'*annulus crossings* (\pm SEM) (E ; ySTD vs aSTD : * $p < 0.05$) et distance (cm) moyenne à l'annulus (\pm SEM) (F ; ySTD vs aSTD : * $p < 0.05$ et aEE vs aSTD : # $p < 0.05$).

entre les groupes de rats âgés. La vitesse a également été évaluée. L'analyse ANOVA ainsi que les comparaisons post-hoc indiquent une diminution de la vitesse de nage dans les groupes de rats âgés par rapport au groupe de rats jeunes adultes (effet 'groupe' : $F_{2/29}=15.27$, $p<0.0001$; aSTD vs ySTD and aEE vs ySTD : $p<0.001$, NK) (figure 1(C)). Ces résultats montrent donc que les trois groupes de rats sont capables d'apprendre à retrouver la plate-forme immergée, même si l'on observe un retard d'apprentissage chez les rats âgés.

Le lendemain du dernier jour d'apprentissage, la plate-forme est retirée et tous les rats passent un test de rappel (*probe trial*) de 60s afin d'évaluer la mémoire spatiale de référence. Pendant ce test, les animaux nagent librement dans le dispositif. Nous avons évalué le temps passé dans le quadrant cible, c'est-à-dire le quadrant où était localisée la plate-forme durant les 5 jours d'apprentissage. Un animal qui a retenu la localisation de la plate-forme va nager préférentiellement dans ce quadrant de la piscine. Au contraire, un animal qui n'a pas retenu cette localisation passera un temps équivalent dans les 4 quadrants (soit 15s/quadrant environ). Seuls les groupes ySTD et aEE passent significativement plus de temps que le hasard (15s) dans le quadrant cible ($\alpha p<0.05$) (figure 1 (D)), ce temps étant supérieur à celui du groupe de rats âgés élevés en conditions standard (aSTD) (effet 'groupe' : $F_{2/29}=5.64$, $p<0.01$; ySTD vs aSTD et aEE vs aSTD : $p<0.05$, NK). Ces résultats indiquent que l'exposition à un EE améliore la consolidation des rats âgés, processus normalement dégradé lors du vieillissement.

Nous avons ensuite étudié certains paramètres de précision. Tout d'abord, l'annulus est défini comme la zone où était située la plate-forme lors de l'acquisition, élargie de 10 cm. Nous avons évalué d'une part, les *annulus crossings*, c'est-à-dire le nombre de fois où l'animal traverse l'annulus lors du test de rétention, et d'autre part, la distance moyenne à l'annulus, c'est-à-dire la distance moyenne où se trouve l'animal par rapport à l'annulus durant le test de rétention. Le nombre d'*annulus crossings* (figure 1(E)) est supérieur chez les ySTD par rapport au groupe aSTD (effet 'groupe' : $F_{2/29}=3.42$, $p<0.05$; ySTD vs aSTD : $p<0.05$, NK). L'effet de l'EE n'est pas flagrant sur ce critère, seule une tendance se dégage. Par ailleurs, la distance moyenne à l'annulus (figure 1(F)) est diminuée chez les rats ySTD et aEE par rapport aux rats aSTD (effet 'groupe' : $F_{2/29}=8.48$, $p<0.01$; ySTD vs aSTD et aEE vs aSTD : $p<0.05$, NK). Concernant ce critère de précision, les performances des rats âgés élevés

en EE sont similaires à celles des rats jeunes adultes car leur recherche de la plate-forme, tout comme celle des rats jeunes adultes, se fait en moyenne plus près de l'annulus.

Les résultats du test de rétention nous indiquent, d'une part, que seuls les rats ySTD et aEE montrent une préférence pour le quadrant cible, et d'autre part, que les rats aEE présentent des performances de rétention quasiment similaires à celles des rats ySTD.

L'ensemble de ces résultats montre qu'à 24 mois, les rats sont capables d'apprendre à retrouver une plate-forme immergée, même s'ils présentent un retard d'apprentissage par rapport à des rats jeunes adultes de 7 mois. Par ailleurs, les performances obtenues durant le test de rappel suggèrent que les rats âgés ayant été élevés en EE sont capables de retrouver la localisation de la plate-forme après 24h alors que les rats âgés élevés en environnement standard ne le sont pas. Pourtant, les deux groupes de rats étaient capables d'apprendre la localisation de celle-ci après 5 jours d'apprentissage, ce qui suggère que les rats élevés en conditions standard présentent un déficit de consolidation de la mémoire spatiale, déficit compensé par l'élevage en EE.

Ces données indiquent qu'une exposition de 6 mois à un EE, débutant à l'âge de 18 mois chez le Rat, est capable de contrer les déficits de mémoire spatiale de référence normalement observés lors du vieillissement.

2. Effet des conditions d'élevage au niveau cellulaire

2.1. Effet de l'âge et des conditions d'élevage sur les marqueurs des cellules gliales et neuronales

Il est connu que le vieillissement provoque une astrogliose dans l'encéphale chez le Rongeur et que dans certains cas, l'EE est susceptible d'influencer cette astrogliose liée à l'âge. De plus, il est établi que le vieillissement peut entraîner une perte neuronale modérée (pour revue : Fjell et Walhovd, 2010). Nous avons donc évalué l'impact de l'EE sur la proportion de cellules gliales et neuronales dans l'hippocampe dorsal. Dans ce but, nous avons utilisé la *glial-fibrillary acidic protein* (GFAP), un filament intermédiaire retrouvé dans les cellules gliales du système nerveux central et notamment les astrocytes, et la sous-unité beta 3 de la tubuline (tubuline $\beta 3$), un composant spécifique des microtubules neuronaux.

Après l'euthanasie des rats *Home cage* (conditions basales) provenant des 3 groupes (ySTD, aSTD et aEE), l'hippocampe dorsal a été prélevé et les niveaux d'ARNm de *GFAP* ont été mesurés par RT-qPCR. Nous avons montré une augmentation de l'expression des ARNm *GFAP* de 50% dans les groupes de rats âgés (aSTD et aEE) par rapport au groupe de rats jeunes adultes (ySTD) (ySTD vs aSTD et ySTD vs aEE : ** $p < 0.01$), alors que l'on n'observe aucune différence significative entre les groupes aSTD et aEE (figure 2 (A)). De façon cohérente, ce résultat a été confirmé au niveau protéique par *western blot* (ySTD vs aSTD et ySTD vs aEE : * $p < 0.05$) (figure 2 (A)).

L'expression du marqueur tubuline $\beta 3$ a été mesurée par RT-qPCR. Nos résultats indiquent une diminution des transcrits de l'ordre de 15% dans les groupes de rats âgés (aSTD et aEE) par rapport au groupe ySTD (ySTD vs aSTD et ySTD vs aEE : ** $p < 0.01$) (figure 2 (B)), alors que l'on n'observe aucune différence significative entre les deux groupes de rats âgés.

En accord avec la littérature, le vieillissement entraîne une augmentation significative du ratio cellules gliales/neurones dans l'hippocampe dorsal des rats âgés. Par contre, nos conditions d'EE ne semblent pas affecter ce ratio. Un EE de 6 mois qui débute à partir de 18 mois chez le Rat n'est pas capable de contrer l'astrogliose observée lors du vieillissement.

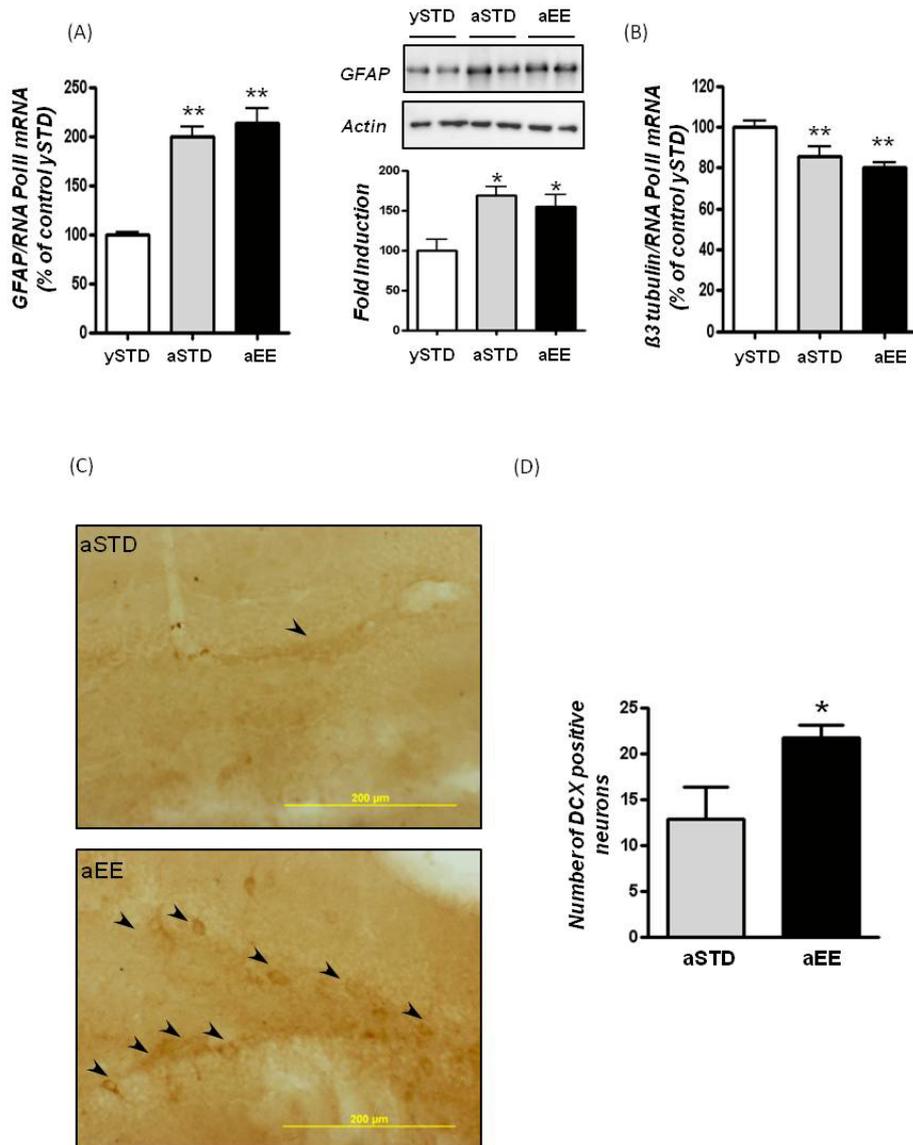


Figure 2. Effet de l'âge et des conditions d'élevage au niveau cellulaire. (A, B) Les marqueurs des cellules gliales (GFAP) et neuronales ($\beta 3$ -tubuline) ont été évalués. Les ARNm de la *GFAP* (A) et de la *$\beta 3$ -tubuline* (B) ont été mesurés en conditions basales, par RT-qPCR, dans l'hippocampe dorsal de rats Home Cage provenant des groupes ySTD, aSTD et aEE. Les valeurs ont été rapportées aux niveaux d'ARNm de l'*ARN polymérase II*. Les moyennes \pm SEM (n=7-10 par groupe) sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe ySTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : **p<0.01, significativement différent du groupe ySTD). Les niveaux protéiques de GFAP ont été mesurés en conditions basales, par *western blot*, dans les extraits nucléaires obtenus à partir de l'hippocampe dorsal de rats Home Cage provenant des 3 groupes. Les résultats sont représentés en duplicat. L'intensité des bandes a été quantifiée et rapportée à celle de l'actine. La moyenne des rapports \pm SEM (n=4 par groupe) est exprimée en pourcentage par rapport au groupe ySTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, significativement différent du groupe ySTD). (C) La neurogénèse hippocampique a été évaluée en conditions basales dans les 2 groupes de rats âgés (aSTD vs aEE). Les niveaux de DCX ont été mesurés par un immunomarquage suivi d'une révélation à la DAB et les cellules positives pour la DCX ont été comptabilisées (n=4 par groupe) (D) (t-test : *p<0.05, aEE vs aSTD).

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'amélioration des capacités mnésiques induite par un EE étant étudiés dans des homogénats hippocampiques, il est nécessaire de se placer dans des conditions dans lesquelles les ratios cellules gliales/neurones sont similaires entre les différents groupes étudiés, et ce afin d'éviter une interprétation biaisée des résultats. C'est pourquoi, nous nous sommes focalisés pour la suite de l'étude seulement sur les groupes de rats âgés (élevés en conditions standard *vs* enrichies).

2.2. Impact de l'environnement enrichi sur la neurogénèse hippocampique adulte

Nous nous sommes intéressés à l'impact de l'EE sur la neurogénèse hippocampique adulte. Il est en effet connu qu'un EE est capable d'induire une augmentation du nombre de neurones nouvellement formés (Kempermann et coll., 1997).

La DCX est une protéine associée aux microtubules des neurones immatures, elle permet donc d'évaluer le nombre de neurones immatures (donc nouvellement formés). Nous avons mesuré en conditions basales, les niveaux de doublecortine (DCX) par un marquage immunohistochimique suivi d'une révélation à la DAB au niveau du gyrus denté des rats âgés. Nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de cellules positives pour la DCX suite à l'exposition des rats âgés à l'EE (figure 2(C-D)).

Ce résultat indique qu'un EE de 6 mois en fin de vie chez le Rat (18 à 24 mois) est capable d'augmenter le nombre de neurones nouvellement formés au niveau du gyrus denté.

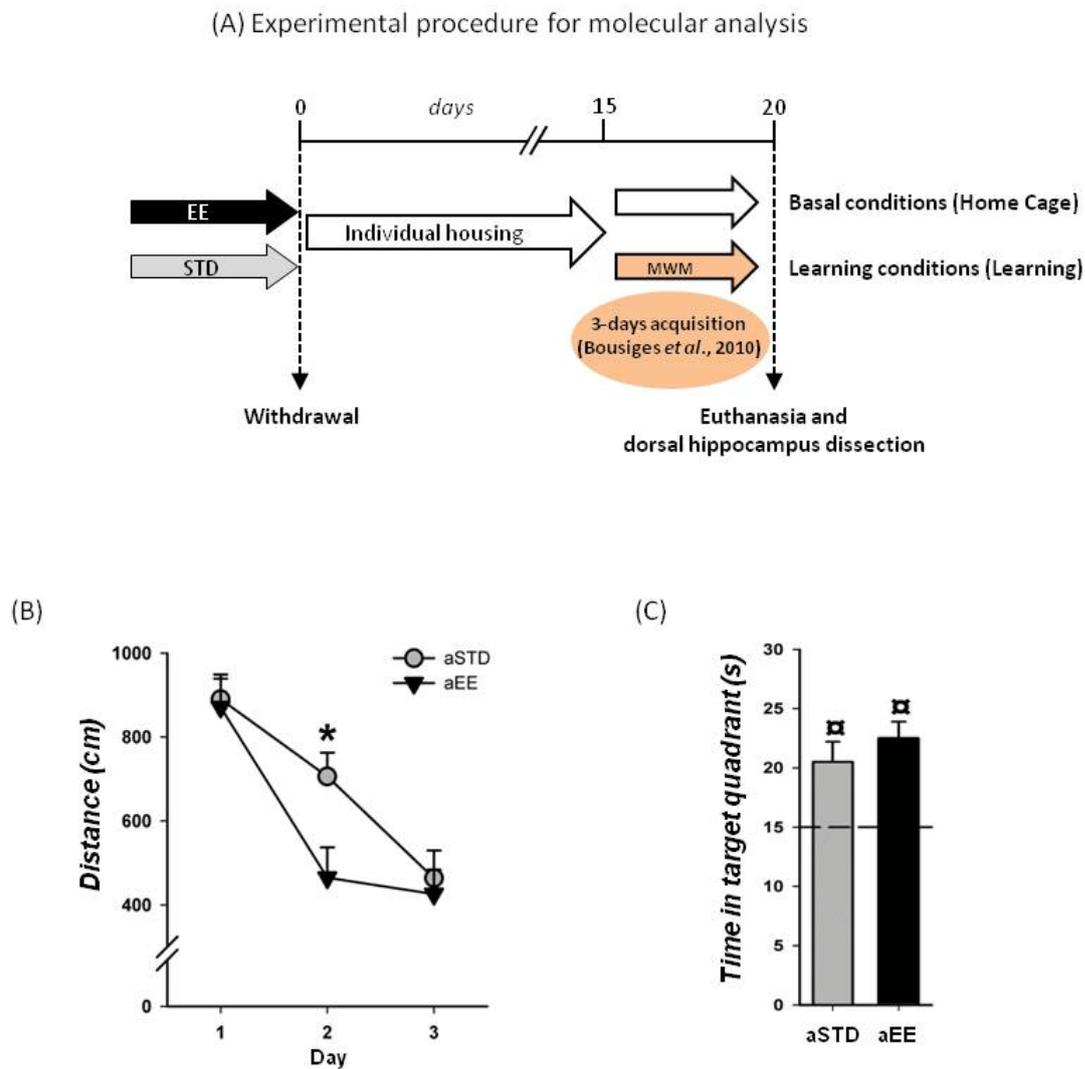


Figure 3. Evaluation de la mémoire spatiale de référence en MWM chez les rats âgés standards vs enrichis, utilisés pour les analyses moléculaires. (A) Procédure expérimentale et formation des groupes pour les analyses moléculaires. (B) Distance (cm) moyenne parcourue \pm SEM (n=16-18 par groupe) pour rejoindre la plate-forme au cours des 3 jours d'apprentissage (aSTD vs aEE * $p < 0.01$). (C) Durée (s) moyenne de nage dans le quadrant cible \pm SEM (n=16 par groupe) lors du test de rétention effectué 1h après la fin de l'apprentissage (t-test : * $p < 0.01$, significativement différent du hasard (15s)).

3. Démarche expérimentale pour les analyses moléculaires

Le but de cette étude est d'évaluer l'impact des conditions d'élevage en EE sur certains marqueurs génétiques et épigénétiques (acétylation des histones) impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, au niveau de l'hippocampe dorsal. Pour ce faire, les études ont été menées sur 2 groupes de rats identiques à ceux cités précédemment : aSTD et aEE. Ces groupes ont été analysés soit en conditions basales (Home Cage) soit en condition d'apprentissage (3 jours d'apprentissage en MWM), 20 jours après la fin de l'exposition à l'EE ou l'élevage standard (figure 3 (A)).

L'objectif était de nous placer dans les mêmes conditions d'apprentissage que pour l'étude menée chez le Rat jeune adulte, c'est-à-dire 1h après le 3^e jour d'apprentissage en MWM (Learning : voir condition HPf article 1). Or, au vu des résultats d'acquisition obtenus lors des 5 jours d'apprentissage (voir figure 1 (B)), les rats âgés standards et enrichis sont capables d'apprendre à retrouver la plate-forme immergée mais présentent un retard d'apprentissage par rapport aux rats jeunes adultes. Par conséquent, le choix du délai 3 jours ne semblait pas approprié dans cette version du protocole. Il faut noter que dans ce protocole, les rats découvrent la tâche le premier jour d'acquisition, sans habituation préalable. Ceci pourrait expliquer le retard observé dans le groupe de rats âgés par rapport aux rats jeunes adultes. En effet, il est possible que les rats âgés aient besoin de plus de temps pour s'habituer au contexte expérimental. Dans les conditions de l'article 1, nous avons réalisé 2 jours de plate-forme visible avant les 3 jours d'acquisition. Nous nous sommes donc placés dans ces conditions expérimentales, afin de tenter de réduire ce retard d'apprentissage.

Effectivement, en ce qui concerne l'acquisition, on observe dans l'ensemble des groupes (LaSTD et LaEE), une diminution de la distance parcourue pour atteindre la plate-forme au fur et à mesure des 3 jours d'acquisition, ce qui indique que les 2 groupes de rats sont capables d'apprendre à retrouver la plate-forme (figure 3(B)). Par ailleurs, au 3^e jour d'apprentissage, les 2 groupes présentent des performances comparables. En effet l'analyse ANOVA révèle un effet 'jour' significatif ($F_{2/62}=37.32$, $p<0,0001$) mais pas d'effet 'groupe' ($F_{1/31}=2.16$) ni d'effet de l'interaction ($F_{2/62}=2,86$). Sur le modèle de la publication 1 (Bousiges et coll., 2010), un test de rétention est effectué 1h après le 3^e jour d'acquisition afin d'évaluer les performances de rappel des animaux. Les résultats du test de rétention montrent que les 2 groupes de rats passent significativement plus de temps que le hasard (15s) dans le quadrant cible ($\alpha p<0.01$ vs 15s) (figure 3(C)), ce qui indique qu'à ce délai (1h post-

acquisition) l'ensemble des rats est capable de rappeler la localisation de la plate-forme. Ces données suggèrent qu'ils ne présentent pas de déficits au niveau de la mémoire spatiale évaluée lors d'un test de rétention précoce.

Les rats sont euthanasiés 1h après le dernier essai, immédiatement après le test de rétention, et ce afin de permettre la mise en place de la signalisation moléculaire ainsi que des régulations transcriptionnelles impliquées dans le processus de consolidation de la mémoire spatiale (voir conditions de l'article 1).

4. Effet de l'environnement enrichi sur la voie des acétyltransférases

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'acétylation des histones. Compte tenu de l'implication des enzymes catalysant l'acétylation des histones (HATs) dans la formation de la mémoire à long terme (Chen et coll., 2010 ; Valor et coll., 2011 ; Barrett et coll., 2011 ; pour revue : Barrett et Wood, 2008), nous nous sommes intéressés à la transcription de différentes HATs. Nos travaux antérieurs (article 1, Bousiges et coll., 2010) montrant la régulation dynamique des transcrits de *CBP*, *p300* et *PCAF* en réponse à un apprentissage spatial chez le Rat jeune adulte, nous avons décidé d'étudier ces mêmes HATs. *Myst4*, une HAT récemment associée à certains déficits mnésiques observés lors du vieillissement chez la Souris (Peleg et coll., 2010) a également été testée.

En conditions basales (Home Cage conditions) (figure 4(A)), nous avons observé une augmentation significative de la transcription de *CBP* et *PCAF* dans l'hippocampe dorsal chez les rats âgés élevés en EE (aEE) par rapport aux rats âgés élevés en conditions standard (aSTD) (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$). Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les 2 groupes pour *p300* et *Myst4*, même si *p300* semble présenter une légère tendance à l'augmentation dans le groupe aEE. Dans un contexte d'apprentissage (Learning conditions), nous avons mis en évidence une augmentation significative de *PCAF* (t-test LaSTD vs LaEE : * $p < 0.05$), alors que nous n'observons aucune différence entre les 2 groupes de rats âgés pour la transcription des gènes *CBP*, *p300* et *Myst4* (figure 4(A)).

Nous avons ensuite évalué, en conditions basales, les niveaux protéiques des HATs CBP et PCAF à partir d'extraits nucléaires de l'hippocampe dorsal. Nous avons observé une augmentation significative de la protéine PCAF chez les rats âgés élevés en EE (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$), alors que les niveaux de CBP ne diffèrent pas de manière significative entre les 2 conditions d'élevage (figure 4(B)).

L'augmentation de la transcription de certaines HATs et notamment de la protéine PCAF en réponse à l'EE, pourrait se répercuter sur l'activité des HATs dans l'hippocampe dorsal. Nous avons mesuré l'activité globale des HATs dans des extraits nucléaires obtenus à partir d'hippocampe dorsal (figure 4(C)). En conditions basales (rats Home Cage), on note une augmentation significative de l'activité HAT globale chez les rats âgés élevés en EE (aEE) par rapport aux rats âgés élevés en conditions standard (aSTD) (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$). Une augmentation du même ordre est observée dans le contexte d'apprentissage

spatial chez les rats âgés élevés en conditions enrichies (LaEE) par rapport aux rats âgés élevés en conditions standard (LaSTD) (t-test LaSTD vs LaEE : * $p < 0.05$). Nous avons donc montré que l'exposition de rats âgés de 18 mois à un EE durant 6 mois est capable d'induire une augmentation significative de l'activité HAT globale dans l'hippocampe.

Cependant, il est intéressant de noter que les rats âgés élevés en conditions standards sont capable d'induire l'activité HAT globale en réponse à l'apprentissage (t-test aSTD vs LaSTD : # $p < 0.05$) (figure 4(C)). Ce résultat est en accord avec nos résultats antérieurs obtenus chez le Rat jeune adulte (Bousiges et coll., 2010) et montre que les rats, même âgés, sont encore capables d'activer cette voie de signalisation nécessaire aux processus de consolidation de la mémoire spatiale. On observe une induction similaire de l'activité HAT en réponse à l'apprentissage dans le groupe de rats âgés élevés en EE (t-test aEE vs LaEE : # $p < 0.05$). L'EE et l'apprentissage ont donc un effet additif sur l'activité HAT. Ceci suggère que ces 2 effets sont régulés de manière indépendante, c'est-à-dire *via* l'intervention de HATs en partie différentes, et/ou par une activation transcriptionnelle plus importante de certaines HATs (e.g. *PCAF* (Figure 4(A))).

Nos données indiquent donc que l'apprentissage spatial, mais également l'exposition à un EE sont capables d'induire une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal de rats âgés.

Vu l'augmentation de la transcription de certaines HATs associée à l'augmentation de l'activité HAT que nous avons observées dans les différentes conditions, nous avons ensuite cherché à évaluer leur impact sur l'acétylation des histones. Nous avons décidé de nous focaliser sur l'histone H3. En effet, des études récentes ont montré que l'acétylation de l'histone H3 pouvait être induite en réponse à un EE chez le Rongeur (Fischer et coll., 2007 ; Branchi et coll., 2011) Nous avons mesuré les niveaux d'acétylation de l'histone H3 (au niveau de K9 et K14) par *western blot* dans nos différentes conditions expérimentales (figure 4(D)).

Si l'on s'intéresse aux effets de l'EE, on observe en conditions basales (Home Cage) des niveaux d'acétylation de l'histone H3 significativement supérieurs chez les rats âgés élevés en EE par rapport à ceux observés chez les rats âgés élevés en conditions standard (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$).

Cet effet semble renforcé dans un contexte d'apprentissage (t-test LaSTD vs LaEE : * $p < 0.05$). Il semble donc y avoir à nouveau un effet additif de l'EE et de l'apprentissage par rapport à l'EE seul (comme pour l'activité globale HAT). De manière intéressante, l'apprentissage seul n'active pas l'acétylation de H3 (groupe aSTD). Ces résultats suggèrent donc une perte, avec l'âge, de l'induction de l'acétylation de H3 au niveau global, normalement observée chez les rats jeunes adultes suite à un apprentissage spatial lorsqu'ils sont comparés à des rats Home Cage (article 1 : Bousiges et coll., 2010).

Ces résultats montrent que l'EE est capable d'induire, en conditions basales, l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe dorsal des rats âgés et que cet effet est maintenu, voire renforcé au cours de la consolidation de la mémoire spatiale. Par contre, l'acétylation de H3 ne semble plus être régulée correctement chez les rats âgés standards. Ceci pourrait contribuer, au moins en partie, aux déficits mnésiques observés chez ces rats.

Dans l'ensemble, ces résultats témoignent de l'impact de l'exposition à un EE d'une part, et de l'apprentissage spatial d'autre part, sur l'activité HAT globale dans l'hippocampe de Rat âgé.

Concernant l'EE, l'augmentation de la transcription de certaines HATs, notamment celle de *PCAF*, dans l'hippocampe dorsal, est cohérente avec l'augmentation de l'activité HAT globale. Ces effets se répercutent sur l'acétylation de l'histone H3, qui est augmentée chez les rats âgés élevés en EE.

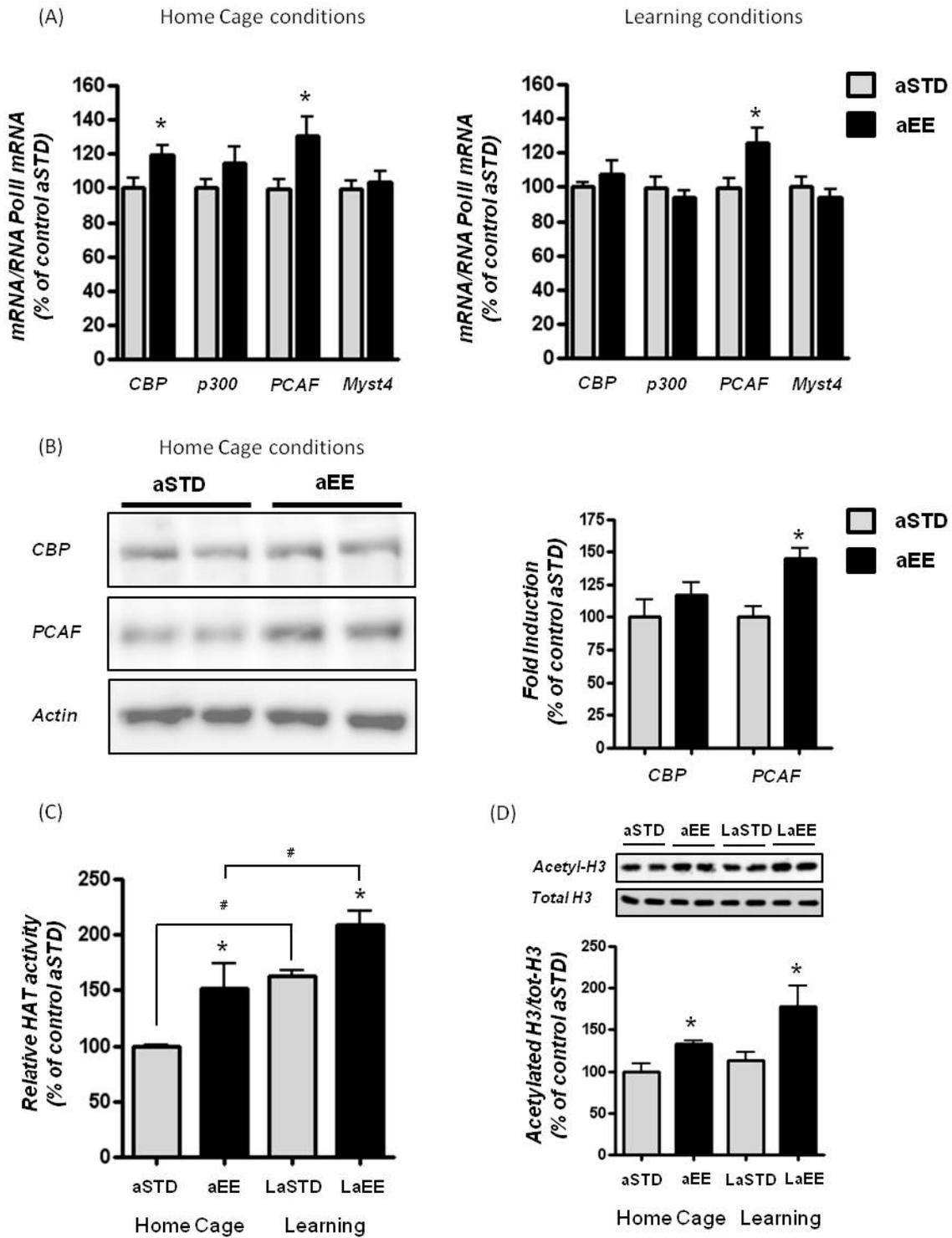


Figure 4. Effet de l'EE et de l'apprentissage sur les mécanismes d'acétylation des histones. (A) Evaluation des niveaux d'ARNm de différentes HATs (*CBP*, *p300*, *PCAF*, *Myst4*) par RT-qPCR dans l'hippocampe dorsal de rats âgés élevés d'une part, en conditions standard (aSTD) et d'autre part, en EE (aEE). Ces niveaux ont été analysés en conditions basales (Home Cage conditions) et dans un contexte d'apprentissage (Learning conditions). Les valeurs ont été rapportées à celles de l'ARN polymérase II. Les moyennes \pm SEM (n=7-10 par groupe) sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe aSTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, significativement différent du groupe aSTD). (B) Les niveaux protéiques de CBP et PCAF ont été mesurés en conditions basales, par *western blot*, dans les extraits nucléaires obtenus à partir de l'hippocampe dorsal des rats Home Cage provenant des 2 groupes de rats âgés. Les résultats sont représentés en duplicat. L'intensité des bandes a été quantifiée et rapportée à celle de l'actine. La moyenne des rapports \pm SEM (n=4-5 par groupe) est exprimée en pourcentage par rapport au groupe aSTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, significativement différent du groupe aSTD). (C) L'activité HAT a été mesurée sur 3 μ g d'extraits nucléaires obtenus à partir de l'hippocampe dorsal des 2 groupes de rats âgés, en conditions basales (Home Cage : aSTD et aEE) et en conditions d'apprentissage (Learning : LaSTD et LaEE). Les moyennes \pm SEM (n=4-5 par groupe) sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe aSTD (Home Cage) fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, aEE vs aSTD et LaEE vs LaSTD ; #p<0.05, Learning vs Home Cage pour chacune des conditions d'élevage). (D) Les niveaux de H3 acétylée ainsi que de H3 totale ont été mesurés par *western blot* sur les extraits protéiques totaux obtenus à partir de l'hippocampe dorsal des 2 groupes de rats âgés. Ces niveaux ont été analysés en conditions basales (aSTD et aEE) et dans un contexte d'apprentissage (LaSTD et LaEE). Les résultats sont représentés en duplicat. L'intensité des bandes a été quantifiée et les niveaux de H3 acétylée ont été rapportés à ceux de H3 totale. La moyenne des rapports \pm SEM (n=3-4 par groupe) est exprimée en pourcentage par rapport au groupe aSTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, aEE vs aSTD et LaEE vs LaSTD).

5. L'environnement enrichi entraîne une augmentation exon-spécifique de la transcription du *bdnf*

Nous avons montré que l'exposition à un EE chez le rat âgé entraîne une augmentation de l'activité HAT globale, associée à une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe dorsal. Afin d'établir un lien fonctionnel entre cette augmentation globale des mécanismes d'acétylation des histones et la transcription de gènes spécifiques, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle d'un gène impliqué dans les mécanismes de plasticité synaptique et de mémoire, le *bdnf*. Notre choix a également été guidé par le fait que différentes études ont montré que les niveaux protéiques du BDNF sont induits par un EE (Ickes et coll., 2000).

Au niveau expérimental, nous avons évalué la production de certains transcrits spécifiques du *bdnf* dans l'hippocampe dorsal, par RT-qPCR. En plus des transcrits du *bdnf* total, nous avons évalué les transcrits des exons I, IV et VI (figure 5(A)).

Si l'on s'intéresse aux effets de l'EE, on n'observe aucune différence significative pour les transcrits des exons IV et VI, que ce soit en conditions basales (Home Cage) ou en conditions d'apprentissage. Par contre, l'élevage en EE entraîne une augmentation spécifique et marquée de la transcription du *bdnf-I*, aussi bien en conditions basales que dans un contexte d'apprentissage (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$; LaSTD vs LaEE : * $p < 0.05$). Cette transcription de l'exon-I se répercute sur l'augmentation du *bdnf* total en conditions basales (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$) et dans un contexte d'apprentissage, même si dans ce cas, la significativité n'est pas atteinte (t-test LaSTD vs LaEE : $p = 0.09$).

Si l'on s'intéresse aux effets de l'apprentissage spatial sur la transcription du *bdnf*, nous avons mis en évidence pour le *bdnf* total une augmentation marquée de sa transcription chez les rats âgés quelque soient les conditions d'élevage (t-test aSTD vs LaSTD : ## $p < 0.01$; t-test aEE vs LaEE : ### $p < 0.001$). De façon similaire, les transcrits de l'exon IV (*bdnf-IV*) sont augmentés en réponse à l'apprentissage, et ce quelque soient les conditions d'élevage (t-test aSTD vs LaSTD : # $p < 0.05$; t-test aEE vs LaEE : # $p < 0.05$). Pour le transcrit de l'exon I (*bdnf-I*), on note également une forte augmentation de sa transcription en réponse à l'apprentissage dans les différentes conditions d'élevage (t-test aSTD vs LaSTD : ## $p < 0.01$;

aEE vs LaEE : # $p < 0.05$). Par contre, aucune différence significative n'est observée pour les transcrits de l'exon VI (*bdnf-VI*).

Ces données montrent que l'apprentissage spatial provoque une augmentation des transcrits du *bdnf* total ainsi que du *bdnf-I* et du *bdnf-IV*. Nos données indiquent une transcription du *bdnf* exon-spécifique en réponse à un apprentissage spatial, chez des rats âgés de 24 mois.

Par ailleurs, quelque soit le contexte expérimental (conditions basales ou apprentissage), la transcription du *bdnf-I* est fortement induite par l'EE, ce qui se répercute sur la transcription du *bdnf* total. Le promoteur I du *bdnf* est donc régulé à la fois par l'apprentissage spatial et par l'EE chez le Rat âgé. De manière intéressante, on retrouve pour le *bdnf-I* l'effet additif de l'apprentissage et de l'EE déjà observé pour l'activité HAT globale et pour l'acétylation globale de H3. Cet effet additif pourrait donc sous-tendre, au moins en partie, l'amélioration des capacités mnésiques observée chez les rats âgés enrichis.

6. L'environnement enrichi ainsi que l'apprentissage entraînent une régulation site-spécifique de l'acétylation de H3 au niveau du promoteur du *bdnf-I*

Nous avons vu que l'EE est capable d'induire, en conditions basales, l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe dorsal des rats âgés et que cet effet est maintenu, voire renforcé au cours de la consolidation de la mémoire spatiale. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une régulation de la transcription du *bdnf-I* à la fois par l'apprentissage spatial et par l'EE chez le Rat âgé. Nous avons ensuite cherché à étudier l'impact fonctionnel des changements d'acétylation de l'histone H3 dans la régulation de la transcription du *bdnf-I*.

Dans cette optique, nous avons étudié l'effet de l'apprentissage et de l'EE au niveau de certaines régions régulatrices du promoteur I du *bdnf*. Nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) *via* l'utilisation du même anticorps que pour le *western blot*, reconnaissant la forme acétylée de l'histone H3 (K9/K14). Nous nous sommes intéressés à 4 sites spécifiques situés dans la région proximale du promoteur : un site NRSE (*Neural-restrictive silencer element*) qui lie le complexe NRSF/REST, un site CRE (*cAMP response element*) qui lie le facteur de transcription CREB, ainsi que deux sites distincts de

liaison au facteur de transcription NF- κ B (figure 5(B)). Le choix de ces sites s'est basé sur les études *in vitro* de Lipsky et collaborateurs qui ont montré une augmentation de l'acétylation de H3 au niveau de certains de ces sites, associée à une activation transcriptionnelle du *bdnf-I*. Par ailleurs, il a été montré que certains de ces sites répondent à l'activation des récepteurs NMDA, évènement indispensable à la mise en jeu des signalisations impliquées dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire (Tian et coll., 2009).

Bien que l'apprentissage n'augmente pas l'acétylation de l'histone H3 au niveau global d'analyse dans l'hippocampe dorsal (figure 4(D)), nos études réalisées ici à l'échelle du gène indiquent que l'apprentissage spatial augmente significativement la proportion en histones H3 acétylées sur toutes ces régions promotrices chez les rats âgés élevés en conditions standard (figure 5 (C-D)) (t-test pour le site NRSE aSTD vs LaSTD : #p<0.05 ; pour le site CRE aSTD vs LaSTD : #p<0.05 ; pour le site NF- κ B2 aSTD vs LaSTD : ###p<0.001 ; pour le site NF- κ B1 aSTD vs LaSTD : #p<0.05). Ces données indiquent que l'ensemble des régions du promoteur I du *bdnf* étudiées répondent à l'apprentissage spatial chez les rats âgés élevés en conditions standard. De manière surprenante, chez les rats âgés élevés en EE, l'apprentissage n'entraîne qu'une augmentation de l'acétylation de H3 sur les sites NF- κ B1 et 2 en comparaison aux rats Home Cage enrichis (t-test pour le site NF- κ B2 aEE vs LaEE : ###p<0.01 ; pour le site NF- κ B1 aEE vs LaEE : #p<0.05).

Concernant l'exposition à l'EE, elle induit une forte augmentation de l'acétylation de H3 au niveau des régions NRSE, CRE et NF- κ B1 en conditions basales (Home Cage) (t-test pour le site NRSE aSTD vs aEE : *p<0.05 ; pour le site CRE aSTD vs aEE : *p<0.05 ; pour le site NF- κ B1 aSTD vs aEE : *p<0.05), alors que le site NF- κ B 2 ne répond pas à l'EE. Dans un contexte d'apprentissage, l'EE a uniquement un effet sur le site 1 de liaison à NF- κ B (t-test LaSTD vs LaEE : *p<0.05).

L'absence d'induction en H3 acétylées, par l'EE, sur les sites NRSE et CRE dans un contexte d'apprentissage, suggère que ces sites sont probablement déjà 'saturés' en réponse à l'apprentissage. Le fait que l'on n'observe pas d'effet additif de l'EE et de l'apprentissage suggère que sur ces sites les mécanismes mis en jeu en réponse à l'apprentissage et en réponse à l'EE sont peut-être similaires. Au contraire, pour le site NF- κ B1, on retrouve cet effet

additif constaté au préalable pour l'activité HAT, l'acétylation de H3 et la transcription du *bdnf-I*. Ceci suggère donc que le site NF- κ B1 est responsable de l'activation transcriptionnelle plus importante du *bdnf-I* chez les rats âgés enrichis *vs* standards observée suite à l'apprentissage spatial.

Ces expériences témoignent donc d'une régulation fine et différentielle de l'acétylation de l'histone H3 au niveau de ces différents sites situés sur le promoteur du *bdnf-I*, en fonction des conditions étudiées.

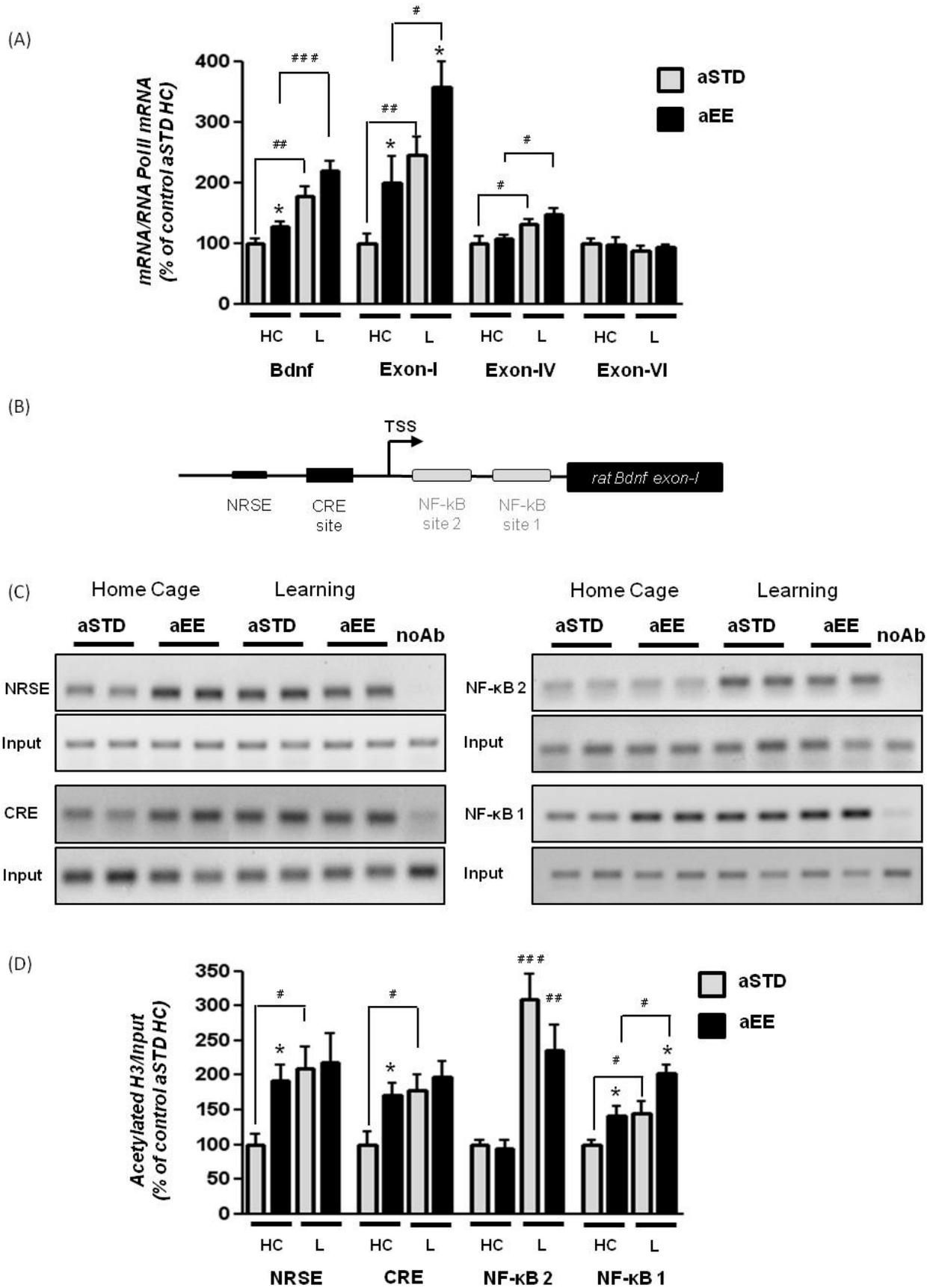


Figure 5. Effet de l'EE et de l'apprentissage spatial sur la régulation de la transcription du *bdnf*. (A) Evaluation des niveaux d'ARNm du *bdnf* total ainsi que des exons -I, -IV et -VI par RT-qPCR dans l'hippocampe dorsal des rats âgés élevés en conditions standard (aSTD) et des rats âgés élevés en EE (aEE). Ces niveaux ont été analysés d'une part en conditions basales (Home Cage : HC) et d'autre part dans un contexte d'apprentissage (Learning : L). Les valeurs ont été rapportées à celles de l'ARN polymérase II. Les moyennes \pm SEM (n=7-10 par groupe) sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe aSTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, aEE vs aSTD en conditions HC et L ; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 HC vs L pour chacune des conditions d'élevage). (B) Représentation schématique du promoteur du *bdnf-I*. Les 4 sites étudiés sont situés dans la région proximale du promoteur (à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS)) et sont reconnus par des facteurs de transcription spécifiques (Tian et al, 2009). (C, D) Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été effectuées à partir de l'hippocampe dorsal des 2 groupes de rats âgés (STD vs EE), en conditions basales (HC) et dans un contexte d'apprentissage (L). (C) La présence de l'acétylation de H3 a été analysée par RT-PCR semi-quantitative. Un point sans anticorps (noAb) a été utilisé pour contrôler la spécificité de l'immunoprécipitation. Les *Input* correspondent à la quantité totale de chromatine utilisée avant précipitation et servent de contrôle positif. Les résultats sont représentés en duplicat pour chaque gène testé. (D) Les valeurs sont rapportées à l'*Input* pour chaque site et les valeurs moyennes \pm SEM (n=4 par groupe) sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe aSTD (HC) fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, aEE vs aSTD en conditions HC et L ; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, HC vs L pour chacune des conditions d'élevage).

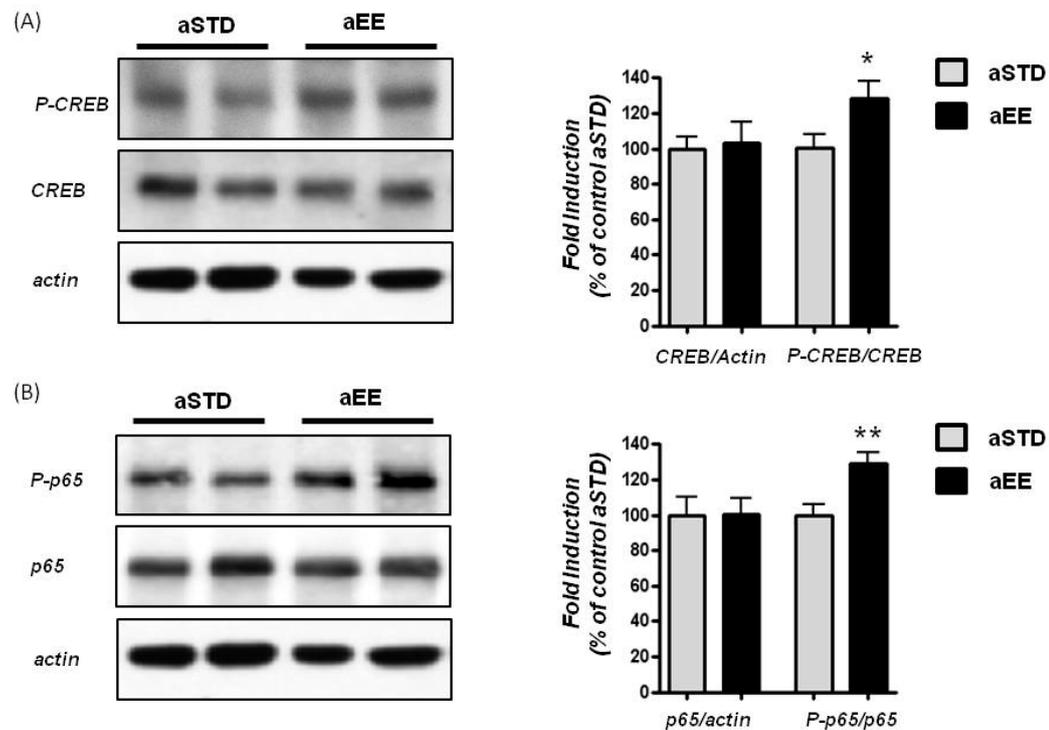


Figure 6. Effet de l'EE sur l'activité des facteurs de transcription CREB et NF- κ B. (A) Les niveaux protéiques de CREB et de sa forme phosphorylée (B) ainsi que les niveaux protéiques de p65 et de sa forme phosphorylée ont été évalués en conditions basales, par *western blot*, dans les extraits protéiques totaux obtenus à partir de l'hippocampe dorsal de rats Home Cage provenant des 2 groupes de rats âgés (aSTD et aEE). Les résultats sont représentés en duplicat. L'intensité des bandes a été quantifiée et rapportée, d'une part, à l'actine pour CREB total et p65 total et d'autre part, à CREB total et p65 total pour CREB phosphorylé et p65 phosphorylé, respectivement. La moyenne des rapports \pm SEM (n=4-5 par groupe) est exprimée en pourcentage par rapport au groupe aSTD fixé arbitrairement à 100% (t-test : *p<0.05, **p<0.01, significativement différent du groupe aSTD).

7. L'environnement enrichi entraîne une augmentation de la phosphorylation des facteurs de transcription CREB et NF- κ B

Au vu des régulations observées au niveau des sites de liaison à CREB et NF- κ B en réponse à l'EE, nous avons cherché à savoir si l'EE était capable d'influencer l'activité de ces facteurs de transcription. Leur activité peut être objectivée en mesurant la phosphorylation de certains résidus sur ces protéines (pour CREB (Gonzalez et Montminy, 1989) et pour NF- κ B (pour revue : Vermeulen et coll., 2002)). Nous avons évalué dans l'hippocampe dorsal des rats âgés en conditions basales (Home Cage), les niveaux de phosphorylation de CREB (Ser133) et de p65 (Rel-A) (Ser536), considérée comme une sous-unité majoritaire du complexe NF- κ B au niveau du SNC.

Les expériences de *western blot* (figure 6 (A)) montrent que l'EE n'influence pas les niveaux de protéine CREB par rapport aux conditions STD, alors que sa phosphorylation est induite de manière significative en réponse à l'EE (t-test aSTD vs aEE : * $p < 0.05$). De façon similaire, la phosphorylation de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B est augmentée en réponse à l'EE, alors que celui-ci n'influence pas la quantité de protéine p65 (t-test aSTD vs aEE : ** $p < 0.01$) (figure 6 (B)).

Ces données suggèrent donc que l'exposition à un EE entraîne une augmentation de l'activité des facteurs de transcription CREB et p65 dans l'hippocampe de rats âgés, et ce en conditions basales (Home Cage).

Dans l'ensemble, nous avons montré qu'un EE de 6 mois chez le Rat est capable d'induire de nombreux changements au niveau des mécanismes d'acétylation dans l'hippocampe dorsal, et ce même lorsque l'exposition débute à un stade de vieillissement avancé (18 mois). Ces changements sont associés à une amélioration de la mémoire spatiale de référence évaluée en MWM chez le Rat âgé de 24 mois ainsi qu'à une augmentation de la neurogénèse hippocampique.

En effet, nous avons montré que l'EE induit une activation de l'expression de certaines HATs, associée à une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal, ce qui se traduit par une hyperacétylation globale de l'histone H3. Ces mécanismes épigénétiques induits par l'EE se répercutent au niveau fonctionnel sur une augmentation de la transcription du *bdnf* à partir de son promoteur I, un gène impliqué dans les phénomènes de plasticité hippocampique (LTP, neurogénèse) et de mémoire. Par ailleurs, l'EE augmente la phosphorylation de facteurs de transcription comme CREB et NF- κ B, qui pourraient également participer à l'augmentation de la transcription de ces gènes associés à la mémoire et/ou la plasticité neuronale.

Il est intéressant de rappeler que l'ensemble de ces changements induits par l'EE est observé en conditions basales (i.e. indépendamment de tout apprentissage spécifique), 20 jours après la fin de l'exposition à l'EE (figure 3 (A)), ce qui montre donc que ces changements sont robustes et stables dans le temps.

Ces régulations épigénétiques (acétylations d'histones) associées à celle de facteurs de transcription spécifiques (CREB, NF- κ B), induites en réponse à l'EE, sont à la base de l'activation transcriptionnelle de gènes tels que le *bdnf*, et pourraient ainsi sous-tendre l'amélioration des capacités mnésiques observées chez les rats âgés enrichis par rapport aux rats âgés standards.

Discussion

Dans notre étude, nous avons montré qu'un EE de 6 mois chez le Rat âgé est capable d'induire de nombreux changements au niveau de l'hippocampe dorsal, et ce même lorsque l'on débute l'exposition à l'EE à un âge avancé (18 mois).

Au niveau comportemental, les conditions d'EE entraînent une amélioration des capacités de mémoire spatiale de référence, évaluées en MWM chez le Rat âgé de 24 mois. Cette amélioration des capacités mnésiques observée chez les rats âgés élevés en EE est associée au niveau cellulaire, à une augmentation de la neurogénèse adulte et au niveau moléculaire, à des changements au niveau des mécanismes d'acétylation des histones.

L'EE induit en effet l'expression de certaines HATs comme CBP et PCAF, ce qui est corrélé à une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal des rats âgés exposés à l'EE. Cette augmentation de l'activité HAT globale est associée à une hyperacétylation globale de l'histone H3 chez les rats âgés enrichis. Ces mécanismes épigénétiques induits par l'EE se répercutent, au niveau fonctionnel, sur la transcription du *bdnf*, une neurotrophine impliquée dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire. On observe, chez les rats âgés exposés à l'EE, une augmentation de la transcription du *bdnf* à partir de son promoteur I, associée à une augmentation de l'acétylation de H3 au niveau de régions spécifiques de ce promoteur, susceptibles de lier des facteurs de transcription comme CREB, NF- κ B et NRSF. De manière intéressante, nous avons montré en parallèle une augmentation de la phosphorylation de CREB et de p65 (un composant du complexe NF- κ B) dans l'hippocampe dorsal des rats âgés, en réponse à l'EE. Il est important de souligner que l'ensemble de ces changements, observés suite à l'EE, a été mis en évidence en conditions basales (c'est-à-dire indépendamment de tout apprentissage spécifique) 20 jours après la fin de l'exposition. Ceci suggère que l'EE induit des changements robustes et stables au cours du temps.

Ces régulations épigénétiques (acétylation des histones) associées à celles de facteurs de transcription spécifiques (CREB, NF- κ B), observées chez les rats âgés enrichis, permettent

donc d'induire l'expression de facteurs neurotrophiques comme le *bdnf* en réponse à l'EE. Ceci pourrait alors placer l'hippocampe dans une 'configuration pro-mnésique', en favorisant notamment un certain nombre de processus de plasticité hippocampique, comme la plasticité synaptique et la neurogénèse par exemple, et participer ainsi à l'amélioration des capacités mnésiques observée chez les rats âgés exposés à l'EE.

1. L'environnement enrichi entraîne une activation persistante de la voie des histones acétyltransférases (HATs) dans l'hippocampe dorsal de rats âgés.

Dans notre étude, nous avons montré que l'exposition à un EE entraîne une amélioration des capacités de mémoire spatiale chez le Rat âgé de 24 mois. Celle-ci est corrélée à l'activation de l'expression de certaines HATs comme CBP et PCAF, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité HAT globale, associée à une hyperacétylation globale de l'histone H3 dans l'hippocampe dorsal des rats âgés enrichis.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Tsai et collaborateurs qui ont mis en évidence qu'un EE de courte durée est suffisant pour induire une amélioration des capacités mnésiques dans différentes tâches d'apprentissage comme le CFC et le MWM, associée à une augmentation globale de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe de souris jeunes adultes (Fischer et coll., 2007). L'implication de l'acétylation des histones dans les effets pro-mnésiques induits par l'EE est renforcée par le fait qu'un traitement aux HDACi est capable de mimer les effets induits par l'EE aussi bien au niveau de l'augmentation de l'acétylation de ces histones qu'au niveau de l'amélioration des capacités mnésiques (Fischer et coll., 2007). Notre étude souligne donc que l'exposition à un EE, réalisée même tardivement (18 mois), entraîne chez le Rat âgé des effets similaires à ceux observés chez le Rongeur jeune adulte. Ceci renforce l'idée que la plasticité cérébrale est maintenue lors du vieillissement chez le Rat, et ce même jusqu'à un âge avancé (pour revue : Nithianantharajah et Hannan, 2009).

Nos résultats sont particulièrement intéressants compte tenu du fait que le vieillissement s'accompagne d'une perturbation de ces mécanismes d'acétylation, associée à une altération des processus de plasticité synaptique et un déclin des capacités mnésiques. En effet, une diminution des niveaux protéiques de CBP, associée à une réduction globale de l'acétylation des histones H3 et H4, ont été mises en évidence dans l'hippocampe de rats âgés

(22-23 mois) et contribuent à l'apparition de déficits de plasticité synaptique (LTP) (Zeng et coll., 2011). Une autre étude a par ailleurs montré que l'altération des mécanismes d'acétylation des histones, notamment au niveau de l'histone H4, est impliquée dans les déficits mnésiques liés à l'âge chez la Souris (Peleg et coll., 2010). Il est particulièrement intéressant de souligner que dans un modèle de neurodégénérescence (CaMKII-p25), qui présente déjà d'importants déficits mnésiques, une exposition à un EE, tout comme un traitement aux HDACi, permettent de restaurer les capacités mnésiques (Fischer et coll., 2007). En prenant en compte l'ensemble de ces données, notre étude indique qu'une exposition à un EE, même tardive, permet de contrer les déficits mnésiques liés à l'âge, en restaurant notamment les mécanismes d'acétylation des histones normalement altérés au cours du vieillissement.

L'augmentation de la neurogénèse hippocampique que nous avons observée chez les rats âgés enrichis pourrait également participer à l'amélioration des capacités mnésiques. En effet, différentes études corrélient l'augmentation de la neurogénèse à une amélioration des capacités mnésiques, et ce même chez le Rongeur âgé (Drapeau et coll., 2003). De manière intéressante, une étude récente de Barco et collaborateurs a mis en évidence, à l'aide de souris transgéniques, la nécessité de CBP et de son activité HAT dans l'augmentation de la neurogénèse hippocampique induite par l'EE. Ils ont par ailleurs montré que cette augmentation de la neurogénèse en réponse à l'enrichissement est associée à une amélioration des capacités mnésiques spatiales (Lopez-atalaya et coll., 2011). Nos données indiquant une augmentation de CBP et de l'acétylation des histones en réponse à l'EE chez le Rat âgé, ces mécanismes pourraient donc être à la base de l'augmentation de la neurogénèse hippocampique observée chez nos rats âgés enrichis.

Il est intéressant de souligner que l'activation de la transcription des HATs, l'augmentation globale de l'activité HAT et l'hyperacétylation globale de l'histone H3 sont déjà observées en conditions basales, et ce encore 20 jours après l'arrêt de l'exposition à l'EE. Ceci indique donc que nos conditions d'EE (6 mois) entraînent des changements stables, qui perdurent dans le temps. Cette idée est cohérente avec une étude menée par Souza et collaborateurs, qui a montré que les effets bénéfiques induits par l'EE persistent après la fin

de l'exposition et que la durée pendant laquelle ces effets se maintiennent augmente avec la durée de l'exposition à l'EE (Amaral et coll., 2008).

Ces changements au niveau de l'acétylation des histones étant détectables par une analyse de l'hippocampe dorsal pris dans son ensemble, ils influencent certainement la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire. Par conséquent, l'amélioration des capacités mnésiques observée chez nos rats âgés enrichis serait due à la régulation de l'ensemble de ces gènes. Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur l'impact fonctionnel de ces mécanismes d'acétylation sur la transcription du *bdnf*.

2. L'environnement enrichi entraîne une augmentation persistante de la transcription du *bdnf* à partir de son promoteur-I via l'acétylation de H3.

L'augmentation des mécanismes d'acétylation des histones que nous avons observée en réponse à l'EE et qui se traduit notamment par une hyperacétylation de l'histone H3, se répercute au niveau fonctionnel, sur la transcription du *bdnf*. Ce résultat est cohérent avec plusieurs études qui ont montré une augmentation de l'expression du *bdnf* en réponse à différents types d'EE (O'Callaghan et coll., 2009 ; Kuzumaki et coll., 2011). L'augmentation des niveaux protéiques de BDNF a d'ailleurs été corrélée à l'amélioration des performances en MWM, observée chez le rongeur âgé de 12 mois, après 10 mois d'exposition à un EE (Ickes et coll., 2000). Cette augmentation de l'expression du *bdnf* en réponse à l'EE est particulièrement intéressante compte tenu d'une part, de l'implication du *bdnf* dans les processus de plasticité et de mémoire, et d'autre part, de la dérégulation de l'expression du *bdnf* au cours du vieillissement (pour revue : Tapia-aranciaba, 2008). De plus, de nombreuses études ont établi une corrélation entre *bdnf* et neurogénèse (Scharfman et coll., 2005 ; Bergami et coll., 2008). Une étude a d'ailleurs mis en évidence le caractère indispensable du *bdnf* dans l'augmentation de la neurogénèse induite par l'EE. En effet, les souris hétérozygotes BDNF^{+/-} présentent une perte de l'augmentation de la neurogénèse hippocampique, normalement induite en réponse à l'EE (Rossi et coll., 2006). L'augmentation de la transcription du *bdnf* que nous observons pourrait de ce fait contribuer à l'augmentation de la neurogénèse hippocampique observée chez nos rats âgés enrichis.

Plusieurs études récentes ont mis en évidence une régulation exon-spécifique de la transcription du *bdnf* en réponse à différentes conditions d'EE chez le Rongeur jeune adulte (Zajac et coll., 2010 ; Branchi et coll., 2011 ; Kuzumaki et coll., 2011), *via* notamment la mise en jeu de modifications post-traductionnelles des histones dont l'acétylation des histones (Branchi et coll., 2011). De manière intéressante, chez le Rat âgé, une étude récente a mis en évidence une diminution de l'expression de différents transcrits du *bdnf* dans l'hippocampe, et a corrélée celle-ci aux déficits mnésiques liés à l'âge observés dans une tâche d'apprentissage dépendante de l'hippocampe (Chapman et coll., 2011). Les travaux de Xie et collaborateurs ont par ailleurs montré que la diminution des niveaux de BDNF chez le Rat âgé (22-23 mois) contribue à l'apparition des déficits de plasticité synaptique observés au cours du vieillissement. De manière intéressante, cette baisse du BDNF est associée à une diminution de l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau de ses différents promoteurs (Zeng et coll., 2011). Nos données indiquent que l'augmentation de la transcription du *bdnf* en réponse à l'EE se fait à partir de son promoteur I, ce qui suggère que l'augmentation du *bdnf-I* induite par l'EE pourrait, au moins en partie, s'opposer à la diminution de l'expression des différents transcrits du *bdnf* liée à l'âge. Ceci pourrait de ce fait participer à l'amélioration des performances mnésiques des rats âgés enrichis.

Il est intéressant de rappeler que notre étude sur l'expression de différents transcrits du *bdnf* (*bdnf-I*, *bdnf-IV* et *bdnf-VI*) a été réalisée en conditions basales, 20 jours après la fin de l'exposition à l'EE, et que nous n'avons observé une augmentation marquée de la transcription qu'à partir du promoteur I, associée à une hyperacétylation de H3. Trois raisons permettent d'expliquer cette augmentation spécifique et persistante des transcrits du *bdnf-I* en réponse à l'EE.

Tout d'abord, la transcription du *bdnf-I* semble plutôt dépendante du contexte environnemental alors que celle du *bdnf-IV* est induite en réponse à un apprentissage (Lubin et coll., 2008). De plus, l'activation de la transcription du *bdnf-I* est plus sensible aux mécanismes d'acétylation des histones que celle du *bdnf-IV* par exemple. En effet, l'augmentation pharmacologique de l'acétylation des histones *via* un traitement aux HDACi dans des cultures primaires de neurones (hippocampe, cortex) entraîne une augmentation marquée de la transcription du *bdnf-I* alors que celle du *bdnf-IV* n'est pas, ou peu affectée (Tian et coll., 2009 ; Hara et coll., 2009). Enfin, la transcription du *bdnf-I*, suite à une

dépolarisation neuronale, se maintient dans le temps, ce qui n'est pas le cas de celle du *bdnf-IV*, qui est pourtant également activée par la dépolarisation neuronale. En effet, une augmentation marquée de la transcription du *bdnf-I* est encore observée 6h après le retrait de l'agent dépolarisant (KCl) alors que les niveaux de *bdnf-IV* sont à nouveau identiques aux niveaux d'expression basale 2h après le retrait du KCl. De manière intéressante, ce maintien de la transcription du *bdnf-I* est corrélé au maintien des niveaux d'acétylation de H3 au niveau de son promoteur (Hara et coll., 2009).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'augmentation globale de l'acétylation de l'histone H3 en réponse à l'EE se traduit par une activation persistante de la transcription du *bdnf-I* chez les rats âgés enrichis, celle-ci étant plus dépendante du contexte environnemental, plus sensible aux changements d'acétylation des histones et plus robuste dans le temps. Ceci se répercute sur une augmentation persistante de la transcription du *bdnf* total et pourrait donc s'opposer à la diminution de l'expression du *bdnf* observée lors du vieillissement (Zeng et al., 2011). Compte tenu de l'implication du *bdnf* dans les processus de neurogénèse et de mémoire, cette augmentation de la transcription du *bdnf* en réponse à l'EE pourrait donc participer à l'amélioration des capacités mnésiques observée chez les rats âgés enrichis.

3. L'augmentation de l'activité des facteurs de transcription CREB et NF- κ B pourrait contribuer à l'amélioration des capacités mnésiques induite par l'environnement enrichi.

Nos résultats indiquent que l'exposition à un EE entraîne une hyperacétylation de H3 au niveau de séquences promotrices du *bdnf-I*, susceptibles de lier différents facteurs de transcription. En effet, nous avons observé une augmentation marquée de l'acétylation de H3 au niveau des séquences promotrices CRE, NRSE, et NF- κ B1, en conditions basales (Home Cage).

L'augmentation de l'acétylation de H3 au niveau du site CRE pourrait permettre un relâchement de la structure de la chromatine favorable au recrutement du facteur de

transcription CREB et/ou d'autres co-activateurs nécessaires à l'activation du complexe si CREB est déjà présent au niveau du promoteur du *bdnf-I*. Il est intéressant de noter que sur ce site au niveau du promoteur-I du *bdnf*, le recrutement du facteur de transcription CREB est visible 3h après traitement de cultures primaires de neurones de l'hippocampe par du NMDA (50µM), alors qu'une augmentation de l'acétylation de H3 est mesurée sur ce même site CRE dès 45 min (Tian et coll., 2009). Une étude de Tsuda et collaborateurs a par ailleurs souligné que la fixation de CREB au niveau de cette région distale du promoteur-I du *bdnf* contribue largement à son activation transcriptionnelle en réponse à l'activité neuronale (Tabuchi et coll., 2002 (a)). Or, en plus de l'augmentation de la transcription du *bdnf-I*, nous avons également observé une augmentation globale de la phosphorylation de CREB (P-CREB) dans l'hippocampe dorsal, en réponse à l'EE. Nos résultats, associés à ceux de la littérature, suggèrent donc que l'augmentation de l'acétylation de H3 au niveau du site CRE du promoteur-I pourrait favoriser le recrutement de CREB, permettant ainsi l'activation de la transcription du *bdnf-I*, observée chez les rats âgés enrichis.

Ces résultats sont particulièrement intéressants au vu des études sur le vieillissement, qui ont mis en évidence une diminution de la phosphorylation de CREB, et donc de son activité, dans l'hippocampe de rongeurs âgés. Cette réduction de l'activité de CREB lors du vieillissement a été corrélée d'une part, à une diminution des niveaux protéiques de BDNF (Hattigandy et coll., 2005) et d'autre part, à des déficits d'apprentissage et de mémoire dans des tâches dépendantes de l'hippocampe (Xu et coll., 2010 ; Porte et coll., 2008 ; Hattigandy et coll., 2005 ; Kudo et coll., 2005). Au contraire, la surexpression de CREB dans l'hippocampe, *via* l'utilisation d'adénovirus, permet d'atténuer les déficits de mémoire spatiale liés à l'âge (Mouravlev et coll., 2006). Par conséquent, l'augmentation de l'activité de CREB, induite en réponse à l'EE, pourrait contrer la diminution de son activité normalement observée avec l'âge. Ceci pourrait alors favoriser le maintien de la transcription de gènes impliqués dans la mémoire comme le *bdnf* par exemple, et contribuer à préserver les capacités de mémoire spatiale des rats âgés enrichis.

L'augmentation de l'activité de CREB induite par l'EE pourrait également avoir un impact sur d'autres processus, comme la neurogénèse. En effet, plusieurs études ont montré l'importance du facteur de transcription CREB dans la régulation des différents stades du processus de neurogénèse (pour revue : Merz et coll., 2011). La forme phosphorylée de CREB participe par exemple au développement et à la survie des neurones nouvellement formés, et

est fortement corrélée à l'expression de la doublecortine (DCX) (Jagasia et coll., 2009). De manière intéressante, la réduction de l'activité de CREB observée lors du vieillissement est associée à des déficits de neurogénèse (Hattiangady et coll., 2005). Par conséquent, l'augmentation de l'activité de CREB observée en réponse à l'EE pourrait également contribuer à l'augmentation de la neurogénèse observée chez nos animaux âgés enrichis. Ceci est en accord avec les travaux de Shen et collaborateurs, qui soulignent en effet le rôle crucial de l'activation de CREB, non seulement dans l'amélioration de la mémoire spatiale induite en réponse à un EE, mais aussi dans l'augmentation de la neurogénèse induite en réponse à un EE (Zhong et coll., 2009).

Nos données indiquent également une augmentation de l'acétylation de H3 au niveau d'un site NRSE du promoteur du *bdnf-I*. Ce site est susceptible de lier le facteur de transcription REST/NRSF, connu pour réprimer la transcription de certains gènes neuronaux comme le *bdnf* (Zuccato et coll., 2003). De manière intéressante, les études de Lipsky et collaborateurs (2009) ont mis en évidence une diminution progressive de la fixation de REST/NRSF en réponse au traitement NMDA associé à une augmentation de l'acétylation de H3 sur ce site du promoteur I (Tian et coll., 2009). Par ailleurs, il a été montré que REST4, un isoforme spécifique de REST/NRSF est capable de contrer l'effet répresseur de ce dernier, permettant ainsi l'activation de la transcription du *bdnf-I* suite à une dépolarisation neuronale (Tabuchi et coll., 2002 (b)). Compte tenu de ces données et de l'augmentation de la transcription du *bdnf-I* observée dans nos conditions, il est possible que REST4, en dépit de REST/NRSF, soit recruté de manière préférentielle au niveau du promoteur du *bdnf-I*, suite à l'exposition à l'EE. Des expériences de CHIP supplémentaires sont requises afin de vérifier ces hypothèses (augmentation de la fixation de REST4 ou baisse de celle de REST/NRSF).

Cette éventuelle participation de REST/NRSF à la régulation de la transcription du *bdnf-I*, mais certainement aussi à celle d'autres gènes, en réponse à l'EE, est particulièrement intéressante compte tenu du rôle de REST/NRSF dans les processus de neurogénèse (Su et coll., 2004 ; Ballas et coll., 2005 ; Sun et coll., 2005 ; Kuwabara et coll., 2005 ; Conaco et coll., 2006). En effet, des études concernant le complexe REST/NRSF ont montré son implication dans le processus de neurogénèse hippocampique, notamment dans la régulation de l'expression de gènes nécessaires à la transition des neurones immatures en neurones matures (Conaco et coll., 2006). En effet, lors de la différenciation des progéniteurs neuronaux

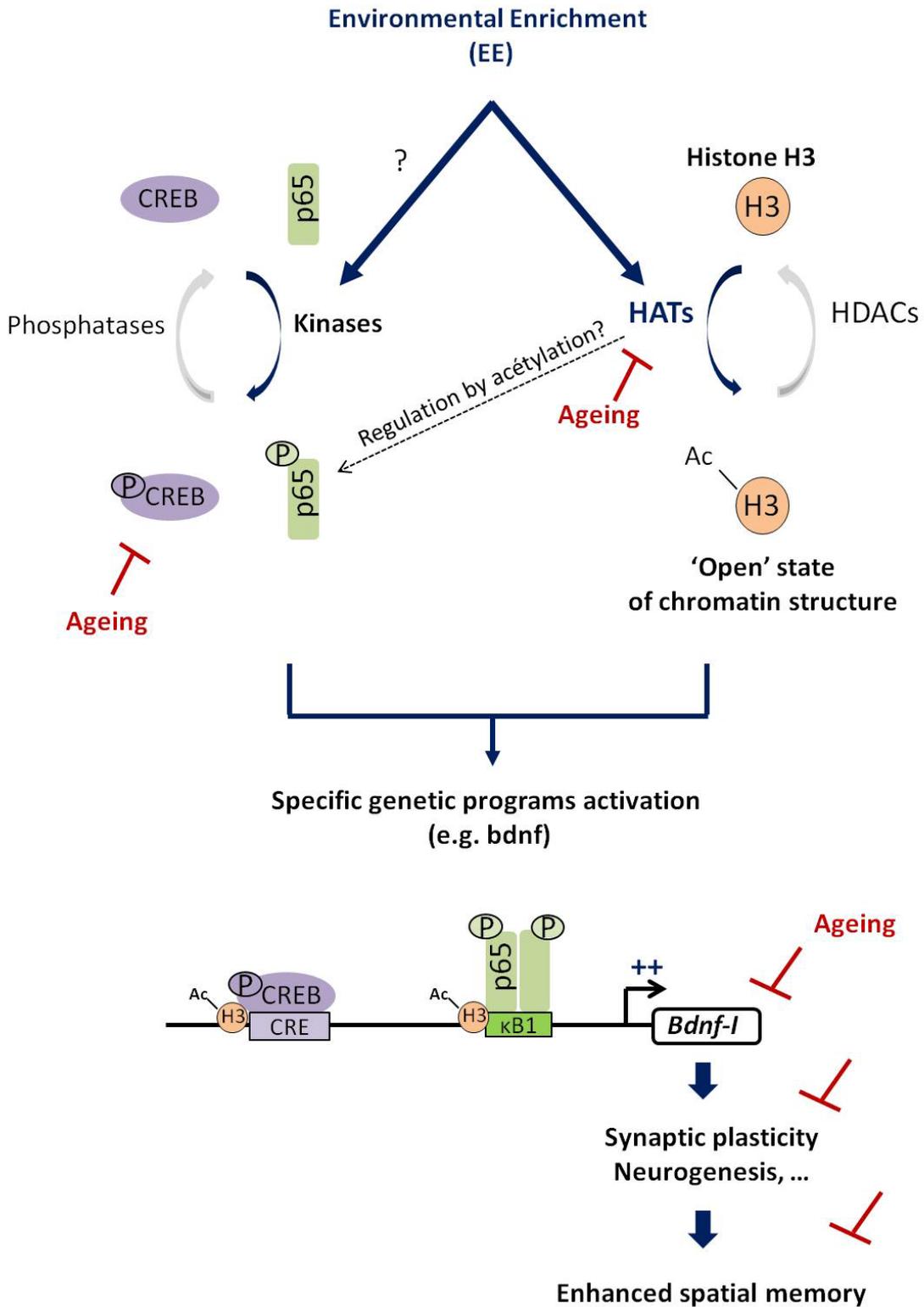
en neurones matures, REST libère le site présent sur un miRNA particulier (miR-124a), entraînant son activation. Ceci permet *in fine* l'action inhibitrice de miR-124a sur de nombreux transcrits non-neuronaux et favorise ainsi la différenciation en neurones matures. Ces données suggèrent donc que REST pourrait, en contribuant à la mise en place des profils d'ARNm 'neuronaux', participer à l'augmentation de la neurogénèse observée chez nos rats âgés exposés à l'EE.

Pour finir, l'hyperacétylation de H3 observée au niveau du site NF- κ B1 pourrait favoriser le recrutement du facteur de transcription NF- κ B au niveau du promoteur du *bdnf-I*. Ceci est appuyé par l'étude *in vitro* de Lipsky et collaborateurs citée précédemment (2009), qui montre que l'augmentation de la transcription du *bdnf-I* induite en réponse à un traitement au NMDA est associée d'une part, à une hyperacétylation de l'histone H3 au niveau de cette même séquence promotrice (NF- κ B1), et d'autre part, aux recrutements de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B et de CBP au niveau de ce même site (Tian et coll., 2009). Il est par ailleurs largement établi que la forme active du complexe NF- κ B est impliquée dans la régulation de la transcription du *bdnf* en réponse à l'activité neuronale (Marini et coll., 2004 ; pour revues : Pang et Lu, 2004 ; Mattson et Meffert, 2006), et notamment dans l'activation de la transcription du *bdnf-I* (Lubin et coll., 2007 ; Tian et coll., 2009). Or, il est intéressant de préciser qu'en plus de l'augmentation de la transcription du *bdnf-I*, nous avons observé, dans l'hippocampe dorsal, une augmentation globale de la phosphorylation de la sous-unité p65 du complexe NF- κ B, qui pourrait donc favoriser l'activation de NF- κ B (i.e. sa translocation dans le noyau). Ainsi, nos résultats, associés à ceux de la littérature, suggèrent que l'augmentation de l'acétylation de H3 observée au niveau du site NF- κ B1 du promoteur-I pourrait favoriser le recrutement de la forme active de p65, ce qui permettrait alors l'activation de la transcription du *bdnf-I* chez les rats âgés enrichis.

L'augmentation de l'activité de NF- κ B induite par l'EE pourrait également contribuer à l'augmentation de la neurogénèse observée chez nos rats âgés enrichis. En effet, une étude récente a indirectement montré son implication dans la transcription des gènes nécessaires à l'augmentation de la neurogénèse induite par un EE chez le rongeur jeune adulte. Des analyses de micropuces à ADN ont révélé une surreprésentation significative des séquences promotrices susceptibles de lier NF- κ B au niveau de nombreux gènes impliqués dans l'augmentation de la neurogénèse observée en réponse à l'EE (Lopez-atlaya et coll., 2011).

Enfin, il faut noter que le site NF- κ B1 est la seule séquence promotrice capable de répondre à l'EE dans un contexte d'apprentissage spatial. En effet, l'augmentation de l'acétylation de H3 par l'apprentissage observée sur les sites CRE et NRSE chez les rats âgés élevés en conditions standard, ne se retrouve pas en conditions d'EE. Ceci suggère que l'effet de l'EE et de l'apprentissage passe par les mêmes voies et qu'un effet additif n'est pas possible. En d'autres termes, ces sites du promoteur pourraient être saturés par les acétylations d'histones, ce qui empêcherait alors les effets de l'EE dans un contexte d'apprentissage. Ceci n'est pas le cas au niveau du site NF- κ B1, sur lequel on observe une augmentation plus importante de l'acétylation de H3 chez les rats âgés enrichis par rapport aux rats âgés standards, suite à l'apprentissage spatial. Ce site, contrairement aux deux autres, est donc toujours dynamiquement régulé par l'EE dans un contexte d'apprentissage. Ceci suggère l'implication du site NF- κ B1 dans l'activation plus importante de la transcription du *bdnf-I* observée chez les rats âgés enrichis par rapport aux rats âgés standards, lors de la consolidation de la mémoire spatiale. Or, ce site est un site de liaison du facteur de transcription de NF- κ B et l'implication de ce dernier dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire, et notamment dans la régulation de la mémoire spatiale, est décrite dans la littérature (O'Mahony et coll., 2006 ; Ahn et coll., 2008 ; Lubin et Sweatt, 2007; pour revue : Kaltschmidt et Kaltschmidt, 2009). Meffert et collaborateurs ont par exemple montré que des souris knock-out pour la sous-unité p65 de NF- κ B (p65^{-/-}) présentent des déficits d'apprentissage spatial (Meffert et coll., 2003). Des déficits similaires ont également pu être observés chez des souris surexprimant l'inhibiteur de NF- κ B (*I κ B α superrepressor (I κ B α -SR)*) dans les neurones du cerveau antérieur (Kaltschmidt et coll., 2006). Nos résultats, associés à ceux de la littérature, suggèrent donc que l'effet additif de l'EE et de l'apprentissage sur l'activation transcriptionnelle du *bdnf-I* serait spécifiquement dû à la liaison de p65 sur le site NF- κ B1 du promoteur I du *bdnf*.

En résumé, nos travaux mettent en évidence, pour la première fois, qu'un EE de 6 mois débutant à l'âge de 18 mois chez le Rat est capable d'entraîner une activation persistante des mécanismes d'acétylation des histones, et de contrer ainsi les effets du vieillissement sur ces mécanismes. Cette augmentation de l'activité HAT se traduit par une hyperacétylation globale de l'histone H3. L'augmentation de l'acétylation de H3 est observée au niveau du promoteur-I du *bdnf*, un gène impliqué dans les processus de plasticité et de mémoire. Elle permet un relâchement de la structure de la chromatine au niveau de ce promoteur, favorable à un éventuel recrutement de facteurs de transcription, comme CREB et NF- κ B (p65), dont l'activité est augmentée en réponse à l'EE. Le recrutement de ces facteurs de transcription, associé à cette conformation 'active' de la chromatine, induit l'activation de la transcription du *bdnf* en réponse à l'EE, tout comme certainement celle d'autres gènes, impliqués dans les processus de neurogénèse et de mémoire. Il est intéressant de noter que nous avons d'ailleurs observé une augmentation de la neurogénèse hippocampique en réponse à l'EE. L'ensemble de ces mécanismes induits par l'EE pourrait donc placer l'hippocampe dans une 'configuration pro-mnésique' et participerait ainsi au maintien des capacités mnésiques (spatiales), normalement dégradées lors du vieillissement.



Modèle hypothétique des mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans l'amélioration des capacités mnésiques (spatiales) induite par l'EE chez le Rat âgé

ARTICLE 3

Fine Tuning of H2B Histone Acetylation: *in vitro* by NMDA Receptor Activation and *in vivo* during Hippocampus-Dependent Memory Formation

Romain Neidl, Olivier Bousiges, Monique Majchrzak, Marc-Antoine Muller, Alexandra Barbelivien, Anne Pereira de Vasconcelos, Anne Schneider, Jean-Philippe Loeffler, Jean-Christophe Cassel et Anne-Laurence Boutillier

Soumission à *Neuropsychopharmacology*

Contexte scientifique et objectifs

La transcription des gènes est régulée, entre autres, par l'intermédiaire de changements opérés au niveau de la structure de la chromatine. Ces changements sont sous-tendus par les modifications épigénétiques, et notamment les modifications post-traductionnelles des histones (pour revue : Graff et coll., 2011). L'acétylation des histones par exemple participe à ces changements de conformation de la chromatine et favorise l'activation de la transcription. Il est maintenant clairement établi que l'acétylation des histones constitue un mécanisme indispensable à la formation de différents types de souvenirs dépendants de l'hippocampe, en permettant une activation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire (pour revues : Barrett et Wood, 2008 ; Sharma, 2010 ; Graff et coll., 2011). Les cascades intracellulaires aboutissant à l'expression de ces gènes sont mises en jeu, pour la plupart, suite à l'activation des récepteurs NMDA (Morgado-Bernal, 2011). C'est pourquoi, plusieurs travaux ont étudié les effets de l'activation de ces récepteurs sur les modifications post-traductionnelles des histones et ont alors observé des changements au niveau des histones H3 et H4 (Crosio et coll., 2003 ; Levenson et coll., 2004 ; Chwang et coll., 2006 ; Levenson et Sweatt, 2005 ; Chandramohan et coll., 2007 ; Reul et Chandramohan, 2007 ; Reul et coll., 2009). En accord avec les résultats obtenus *in vitro*, la grande majorité des études *in vivo* s'est focalisée plus particulièrement sur l'acétylation des histones H3 et H4 en réponse à un apprentissage dépendant de l'hippocampe. Cependant, un certain nombre de données récentes suggèrent l'implication de la régulation de l'acétylation de H2B dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire (Guan et coll., 2009 ; Koshibu et coll., 2009 ; Bousiges et coll., 2010). De manière intéressante, nous avons montré dans une étude antérieure, que l'acétylation de H3 semble plutôt dépendante du contexte environnemental alors que celle de H2B serait spécifiquement induite en réponse à un apprentissage spatial et participe ainsi à la transcription des gènes nécessaires à la consolidation de la mémoire (article 1 : Bousiges et coll., 2010).

L'objectif de ce travail est de préciser l'implication des acétylations spécifiques de chacune de ces histones (H3, H4 et H2B) dans les processus sous-tendant la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe.

Les acétylations des histones H2B et H3 étant régulées de manière différentielle suite à un apprentissage spatial (article 1 : Bousiges et coll., 2010), nous avons tout d'abord cherché à évaluer cette dynamique d'acétylation, *in vitro*, suite à l'activation des récepteurs NMDA. Pour ce faire, nous avons étudié la cinétique d'acétylation de ces deux histones (1h, 4h et 8h) en réponse à deux concentrations différentes de NMDA (50 μ M et 150 μ M), dans une culture primaire de neurones.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets d'un apprentissage dépendant de l'hippocampe sur l'acétylation des histones H2B, H3 et H4, et ce dans deux tâches différentes, afin de voir si les résultats obtenus étaient spécifiques d'une tâche particulière ou s'ils pouvaient être généralisés à un processus plus global d'apprentissage dépendant de l'hippocampe. Les acétylations spécifiques de ces différentes histones (H2BK5K12K15K20, H2BK5, H3K9K14 et H4K12) ont donc été quantifiées par une analyse globale de l'hippocampe dorsal de rats, soit 1h après la fin du premier jour d'acquisition en MWM (groupe plate-forme cachée (HPf)), soit 1h après un CFC (groupe contexte-plus-choc (CS)), en comparaison à des rats naïfs vis-à-vis de ces tâches (groupes home cage (HC)). Afin de distinguer les effets spécifiquement dus à l'apprentissage de ceux éventuellement induits par le dispositif expérimental lui-même, les groupes de rats HPf et CS ont également été comparés à des rats placés dans le même dispositif expérimental mais n'ayant pas de tâche d'apprentissage à réaliser. Ainsi, le groupe HPf a été comparé à un groupe plate-forme visible (VPf), et le groupe CS a été comparé d'une part à des rats exposés uniquement au contexte (groupe contexte-seul (CX)) et d'autre part à des rats recevant un choc électrique dès leur entrée dans le dispositif expérimental (groupe choc-immédiat (IS)).

Fine tuning of H2B histone acetylation: *in vitro* by NMDA receptor activation and *in vivo* during hippocampus-dependent memory formation

Bousiges O^(1,4), Neidl R^(1,4), Majchrzak M⁽¹⁾, Muller MA⁽¹⁾, Barbelivien A⁽¹⁾, Pereira de Vasconcelos A⁽¹⁾, Schneider A⁽¹⁾, Loeffler JP⁽²⁾, Cassel JC⁽¹⁾ and Boutillier AL⁽¹⁾⁽³⁾.

⁽¹⁾ LINC UMR7237, Université de Strasbourg-CNRS, Institut Fédératif de Recherche IFR 37, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France.

⁽²⁾ Inserm, U692, Laboratoire de Signalisations Moléculaires et Neurodégénérescence, Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, UMRS692, Strasbourg, F-67085, France

⁽³⁾ Corresponding author :

Anne-Laurence Boutillier

LINC UMR7237 Université de Strasbourg-CNRS

12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France.

Phone : (+33) 368 85 19 34 Fax : (+33) 368 85 19 58 Email : laurette@unistra.fr

⁽⁴⁾ With equivalent contribution to the work.

***running title:* NMDA- and learning-induced histone acetylation.**

Abstract (190 words)

Recent literature shows that epigenetic mechanisms (e.g., DNA methylation, histone modification) are crucial to gene transcription associated to synaptic plasticity and memory formation. By regulating Ca^{++} influx into neurons, the NMDA receptor is an important molecular mediator of these processes. We first investigated whether histone acetylation responded to NMDA receptor-mediated regulations. In primary neurons, we showed that NMDA triggers concentration- and time-dependent changes in H2B and H3 histone acetylation. We then measured global histone acetylation levels in the rat hippocampus at an early stage of spatial or fear memory formation. We found that H3, H4 and H2B underwent differential acetylation at specific sites depending on whether rats had learnt or not: H3 was most responsive to the learning-independent manipulations, while H2B and H4 were mostly associated with memory for either place or fear. Altogether, these data suggest that, in the hippocampus, regulations of histone acetylation follow a code at the histone level depending on whether a memory trace is established or not: tagging of H3 histones could be associated with perception/processing of testing-related manipulations, while tagging of H2B/H4 histones could be associated with the formation of memories requiring the hippocampus.

Keywords

histone acetylation, long-term memory formation, H2B, NMDA receptor activation

Introduction (589 words)

As a result of dynamic interactions between environmental constraints and an organism's genome, synaptic plasticity and formation of enduring memories require modulations of gene transcription (expression, repression), and thus changes in the chromatin structure. Such changes are catalyzed by epigenetic mechanisms (Graff et al., 2011). Among these mechanisms, histone acetylation appears to be one of the critical processes contributing to the formation of lasting memories, as shown in rodents subjected to fear conditioning (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2007; Peleg et al., 2010), subsequent extinction (Bredy et al., 2007; Bredy and Barad, 2008), object recognition (Koshibu et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Barrett et al., 2011), or place learning in the Morris water maze (Bousiges et al., 2010) (for reviews (Barrett and Wood, 2008; Sharma, 2010; Graff et al., 2011)). So far, such studies have mainly focused on histones H3 and H4, and learning and memory-related acetylations of other histones have been less investigated. Nevertheless, a recent series of results makes the H2B histone a possible target for regulations involved in memory formation and consolidation processes. For instance, HDAC2 knock-out mice showing increased acetylation levels of H2B (among others) in their hippocampus (Guan et al., 2009) also display improved memory functions; genetic inhibition of protein phosphatase 1 (PP1) in mice brain both enhanced long term potentiation (LTP) and increased H2B acetylation in the hippocampus (Koshibu et al., 2009). A recent paper described that depolarization of hippocampal slices maintained *in vitro* induced H2B acetylation within minutes (Maharana et al., 2010), suggesting that H2B could mediate activity-dependent signalings in the hippocampus. Lastly, our recent work showed that H2B histones were dynamically regulated during the consolidation of a spatial memory: H2B acetylations were increased in the dorsal hippocampus of rats learning the location of a platform hidden in a water maze, and this training-induced acetylation of H2B was strongly diminished in a rat model invalidating spatial memory consolidation by damage to cholinergic and glutamatergic hippocampal inputs (Bousiges et al., 2010). Memory consolidation involves NMDA receptor-mediated signalling (Morgado-Bernal, 2011), and several studies showed that NMDA receptor activation triggered or mediated behavioral-induced epigenetic modifications of the H3 histone, such as acetylation of lysine 14 and/or phosphorylation of serine 10 (Crosio et al., 2003; Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006; Levenson and Sweatt, 2006; Chandramohan et al., 2007; Reul and Chandramohan, 2007; Reul et al., 2009). So far, however, no information is available on the effect of NMDAR activation on H2B post-translational modifications.

Therefore, the current study first focused on the time course of H2B and H3 acetylations in primary neuronal cultures exposed to NMDA. We found that direct NMDAR activation was able to rapidly, concentration-dependently and differentially modulate the acetylation status of H2B and H3 histones at the global level. We then assessed whether H2B acetylation was impacted in the hippocampus of rats at the start of spatial learning. Indeed, as in a previous experiment, we demonstrated H2B acetylation regulations after 3 days of place learning in a water maze (Bousiges et al., 2010) and given the rapidity of NMDA effects *in vitro*, the current study evaluated H2B modifications after a one-session water maze training.

Finally, as it is yet unknown whether these changes concern specifically place learning or more generally hippocampus-dependent learning, we investigated histone acetylation modulation during place learning vs. contextual fear conditioning. Together with H2B, acetylation modifications of H3 and H4 histones was assessed in parallel. Our results emphasize distinct regulations detectable in whole dorsal hippocampus homogenates, H2B and H4 being modulated with the establishment of a learning trace (platform location, context-shock association), and H3 acetylation marking changes that are most probably not related to memory trace formation.

Materials and methods

Primary culture of cerebellar granule neurons (CGN) and NMDA treatments

CGN cultures were obtained from dissociated cerebella of 7-day-old mice (inbred SWISS CD-1 strain) as described previously (Boutillier et al., 2003). Briefly, cerebella were subjected to enzymatic digestion (trypsin), followed by mechanical dissociation with a pipette. Cells were seeded at a density of 10^5 cells/mL in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with B27, 25mM KCl, L-glutamine (Glutamax) and 50 μ g/mL gentamycin, on L-polyornithine (0.1 mg/mL)-coated 12-well dishes. Medium culture was changed every 48 hours. Cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air during five days. Drug solutions were prepared in the same medium as used for culture with concentrations of 50 or 150 μ M NMDA (M3262, Sigma-Aldrich, Lyon, France). The cultures were exposed to the drug solutions for 1, 4 or 8 hours. Cultures were then washed with ice cold-PBS, and cells were collected in Laemmli buffer before further processing for biochemical studies.

Animals

The study was in compliance with the regulations specified by the European Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (authorization no. 67-215 for JCC). For Morris Water Maze and contextual fear conditioning experiments, 79 Long-Evans male rats (Centre d'Élevage René Janvier, France), about 3-4 months old at the time of behavioural testing, were used. They were individually housed in standard plastic cages (42 X 29 X 15 cm) with food and water provided *ad libitum*, in a temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$)- and humidity ($55 \pm 5\%$)-controlled room under a 12h-12h light-dark cycle (lights on at 8:00 a.m.).

Morris watermaze

The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Bousiges et al., 2010). Briefly, for all rats, the first part of training was a four-trial session using a visible platform (VPf) located in the south-east quadrant of the pool. The trials were started randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. The rats which had to learn the location of a hidden platform (HPf) 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 1–3 consecutive days. The platform was hidden 1 cm below the water surface in the north-west quadrant. The distance travelled before reaching the platform was recorded by a video tracking system (Ethovision, Noldus, the Netherlands). Control rats had to swim to a visible platform (VPf) emerging 1 cm above the water surface, and of which the location was changed from trial to trial on each day. This procedure was used to prevent the association of a spatial cue with the platform. 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. To this end, after the platform had been removed from the pool, all rats from the HPf group were released from the north-east start point and allowed to swim for 60 s. 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 a too stressful experience for the animals.

Contextual fear conditioning

Rats were weighted (267.80 ± 1.18 g) and handled for 6 consecutive days (1 min/day/rat) before conditioning. Behavioural experiments were conducted between 09:00 and 12:00. Fear conditioning took place in two identical Plexiglas chambers (25 x 27 x 18 cm) placed in ventilated (background noise between 65.7 and 70.2 dB) light- and sound-attenuated boxes (57 X 38 X 38 cm, Campden Instruments LTD). An illumination of 6 Lux was maintained by a bulb through a frosted plastic plate. The grid floor of each chamber consisted of parallel 0.3 cm diameter stainless-steel bars, 0.8 cm apart, connected to a shock generator (0.6 mA, 0.8 s, scrambled) controlled by a computerized interface (Med-PC, Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA). A camera (MCT-210 MS, OptoVision, Toulouse, France) was fitted inside each box, above the center of the chamber, and monitored the entire chamber from the top through a 2.45 mm wide angle lens. Video signals of cameras were sent to a PC (Pentium) equipped with a Scion LG3 video capture card (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) via a Quad-type multiplexer (Computar QSMX-II). Four conditions were used: contextual fear conditioned rats received 3 foot shocks 180 s, 241 s and 362 s after the placement in the chamber (context-shock, CS), a control group received 3 foot shocks delivered 1 s, 3s and 5s after their placement in the chamber (immediate-shock, IS), one group was left in the context, receiving no foot shock during the session (context group, CX), and a last group group of rat stayed in their cage (Home Cage, HC). Each training condition lasted 8 min. After training, all rats were returned to their home cage and left undisturbed until either euthanasia (n=6/group) or behavioural testing for retention (10 rats/group), which was performed with a 24-h delay. To this end, automatic freezing measurements were carried out during an 8-min session, as described in detail by Marchand and collaborators (Marchand et al., 2003).

Preparation of Tissues for Western Blot Analyses

Euthanasia occurred 1 hour after the last trainings (either place learning or fear conditioning), except that rats of the MWM experiments, underwent a rapid probe trial (30 seconds) right before. This 1-h delay enables early signal transduction and transcriptional regulation processes to start. All animals were killed by decapitation, their brains rapidly removed from the skull and transferred on an ice-cold glass plate. Freshly dissected tissues (dorsal hippocampi) were then immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until being processed for biochemical studies (total protein extraction).

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 and centrifuged (20 000 g, 5 min). Protein concentration was measured in the supernatant using the RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). Western blots were performed as described previously (Bousiges et al, 2010), with polyclonal antibodies against acetyl-histone H2B (H2B tetra-Ac, 07-373 and H2BK5, 07-382), acetyl-histone H3 (06-599) (Upstate Biotechnology, New York, NY, USA), acetyl-histone H4 (39165) (Active motif Carlsbad, CA, USA), histone H3 (ab24834), histone H4 (ab31830) (Abcam, Cambridge, UK), histone H2B (H2-2A8), (Euromedex, France). Secondary antibodies were a horseradish peroxidase-conjugated whole-goat anti-rabbit IgG (111-035-003), or a horseradish peroxidase-conjugated whole-goat anti-mouse IgG (115-035-003) (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Blots were revealed with BioFX[®] HRP chemiluminescent substrates SERI (SurModics, Eden Prairie, MN, USA) and exposed with Kodak BioMax light film (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Results were quantified using the ImageJ software. For each histone (either total or modified), we performed western blot analyses on increasing amounts of total protein extracts and determined the adequate amount within the linear range of detection, that was further used for quantitative western blots analyses of each sample. Typical blots obtained for total and acetylated H2B are shown in the supplemental figure.

Statistical analysis

Behavioural studies. Spatial learning performance recorded during acquisition was analyzed using a two-way ANOVA with repeated measures considering days (1–3) and platform condition (HPf vs. VPf). Probe trial performance was analyzed using a one-way ANOVA. An additional t-test was performed to compare the time spent in the each quadrant to chance (i.e., 15 s). When appropriate, post hoc comparisons used the Newman–Keuls (NK) multiple range statistic. Freezing was computed as the percentage of time spent at freezing over the 8-min test session. It was analyzed using an ANOVA with “Training condition” as the between-subject factor. The ANOVA was complemented by post hoc Newmann-Keuls tests when appropriate. In all cases, the threshold for rejecting the null hypothesis was set at $\alpha < 0.05$.

Biochemical studies. Statistical analyses were performed using Student’s t-test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests. Data are expressed as the mean \pm SEM. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

Results

NMDA treatment differentially modulates H2B and H3 histone acetylation in a time- and concentration-dependent manner in primary neurons.

We investigated the effect of NMDA receptor (NMDAR) activation on H2B and H3 histone acetylation, using cerebellar granule neurons cultured *in vitro* as a model system (D'Mello et al., 1998; Boutillier et al., 2003). These cells represent a homogenous population of primary neurons and after a few days of culture *in vitro*, they express glutamate receptors (including NMDAR), produce glutamate and release it (Kramer and Minichiello, 2010).

We determined the time course (1, 4 or 8 h) of the histone H3 and H2B acetylation status following a treatment with a moderate (50 μ M) and a higher (150 μ M) concentration of NMDA (Figure 1). For 50 μ M NMDA, we found that, while H3 acetylation levels were increased (1.52 fold, $p < 0.001$) upon a one-hour treatment, H2B histone acetylation levels showed a significant decrease (0.7 fold, $p < 0.05$) as compared to non-treated controls. However, H2B histone acetylation peaked at 4 hours (1.96 fold, $p < 0.01$), a time at which histone H3 acetylation levels had returned to baseline values. After an 8 hour-treatment, both H3 and H2B histone acetylation levels were close to control. These results show that a 50 μ M NMDA treatment differentially modulates H3 and H2B histone acetylation in primary neurons over time. Upon a treatment with 150 μ M of NMDA, a significant increase of histone H3 acetylation was measured after one hour. This increase was more pronounced than with 50 μ M (2.34 fold compared to control, $p < 0.001$ with 150 μ M NMDA; $p < 0.001$ compared to 50 μ M of NMDA). After 4 and 8 hours of treatment, however, 150 μ M of NMDA had not affected global histone H3 acetylation as compared to non-treated controls. As with 150 μ M NMDA treatment, H2B histone acetylation levels firstly presented a significant decrease compared to control (0.60 fold, $p < 0.05$), but no change was detected at both subsequent time points, a result significantly different ($p < 0.01$) from that obtained for 50 μ M at 4h. Thus, 150 μ M of NMDA also induced acetylation kinetics that were different for H2B and H3 histones. Figure 1B recapitulates H3 and H2B histone acetylation kinetics in primary neuronal cultures following a 50 μ M (left) and a 150 μ M (right) NMDA treatment.

On the one hand, NMDA receptors have been largely implicated in synaptic plasticity, learning and memory (Levenson et al., 2004; Levenson and Sweatt, 2006). On the other hand, we have previously shown that H2B and H3 acetylation levels were differentially regulated during formation and consolidation of a spatial memory in the Morris water maze (Bousiges et al., 2010). Our data obtained in primary neurons now clearly show that NMDA receptor activation can trigger acetylation of both H3 and H2B histones, with profiles affected by the duration and concentration of NMDA treatment, suggesting a different integration of the stimulating signal at the transcriptional level. This may have a functional significance. For instance, it may influence a specific cellular function or, at the organism level, a behavioral response. We therefore tested if and how H2B and H3 histone acetylations were modulated in the hippocampus of rats subjected to two hippocampus-dependent learning tasks as compared to non-learning controls.

Histone acetylation profiles during spatial memory formation in the Morris Watermaze.

We have previously investigated histone acetylation levels in the hippocampus of rats subjected to a spatial reference memory task. This experiment was performed in a time window corresponding mainly to an already ongoing consolidation process as rats were killed after three days of acquisition (4 trials/day) in the Morris Water Maze, a time point at which they clearly remembered the platform location. We found H2B and H3 histone acetylation levels to follow a learning-sensitive regulation (Bousiges et al., 2010). In this study, we have further investigated whether acetylation modifications could be modulated at the beginning of the training, when rats are just discovering the task and consolidation processes are only at the very early steps of their onset. Therefore, we trained different groups of rats during only 1 day. As in the former experiment (Bousiges et al., 2010), one control group consisted in rats taken from their home cage, while another group of rats were trained to reach a visible platform. In order to verify that learning was occurring in our experimental conditions, another group of rats was trained for 3 days. Acquisition performances (distance to the platform) on figure 2A (left) and retention (time spent in the target quadrant) performances measured one hour after the last trial, on figure 2A (right) (after a 1-day and a 3-day training). As rats were killed immediately after the probe trial, it can be assumed that the probe trial had little effects on histone acetylations. For their probe trial, control rats had to swim to a visible platform (VPf) as during the training. As expected, the retention results show that after the first day of training, rats did not spend a significantly longer time in the target quadrant while after 3 days of training, performance was significantly above chance in the target quadrant (quadrant effect 2 way-Anova $F(3,12)= 11.84$, $p<0.001$; time in target quadrant versus 15sec: $t(3)= 3.18$, $p<0.05$), indicating efficient memory formation.

Experiments were then undertaken in the 1-day experimental group, thus at a time point at which we had no behavioural evidence for a consolidated memory trace, but rats had experienced the learning task. H2B, H4 and H3 acetylation levels were monitored in the hippocampus of each of these animals (Figure 2B). We measured acetylation levels on 3 major histones (H2B, H3 and H4) previously shown to be modulated in response to learning (Graff et al., 2011). The hyperacetylated status of H2B (H2B K5K12K15K20, tetra Ac) was evaluated as in neuronal cultures and according to our previous studies (Bousiges et al., 2010), and together, H2B K5 acetylation status was also evaluated, as this modification was recently described to be highly responsive to CBP (Valor et al., 2011). Representative western blot results for 2 animals are shown on the left and quantification is shown on the right ($n=5$). Global H2B histone acetylation (tetra Ac) was significantly increased in the learning group (HPf) compared to VPf and HC control groups (figure 2B; 1.50-fold, when compared to VPf, $p<0.01$; 1.56-fold, when compared to HC, $p<0.05$). H2B histone acetylation was not different between VPf and HC groups. H2BK5 was also significantly up-regulated in the HPf group compared to HC and VPf groups (figure 2B; 1.38-fold, when compared to VPf, $p<0.001$; 1.3-fold, when compared to HC, $p<0.05$). Modifications of H4 histone K12 acetylation have been associated with memory formation (spatial memory formation, (Bousiges et al., 2010); contextual fear conditioning, (Peleg et al., 2010)). H4K12 acetylation was significantly

increased in the learning group compared to controls (figure 2B; 1.41-fold, when compared to HC, $p < 0.05$; 1.29-fold, when compared to VPf, $p < 0.05$). Here again, no significant change was measured between HC and VPf groups, a result similar to that found for H2B acetylation. By contrast, in comparison with the HC group, H3 histone acetylation was also modulated in rats trained in the water maze, but the change was of comparable magnitude with the visible (1.79-fold, $p < 0.001$) and the hidden platform (1.74-fold, $p < 0.001$).

In summary, our data clearly show that after a few training trials given in a single session, when no evidence for consolidation can be measured yet in a probe trial and learning experience has just started, there is a learning-related acetylation of H2B and H4 and a swimming/context-related acetylation of H3 in the hippocampus. These results are reminiscent with our recent observations (Bousiges et al., 2010) in the hippocampus of rats that had received enough training to consolidate a representation of the platform location (Figure 2A, right panel). Overall, it seems that some acetylation modifications on H2B (K5 and tetra-acetylation) and H4 (K12) histones are consistently associated with early stages of spatial learning, be it in relation with an already consolidated memory or not, whereas those on H3 (K9K14) histones might much more reflect aspects of task-context processing (swimming, stress, exploration...). This task-sensitive difference detectable at the global level suggests that hippocampal neurons do not integrate external signals in the same way on the histones in order to prime an adequate transcriptional response that may influence behavioral functions.

Histone acetylation profiles during contextual fear conditioning.

Having shown a specific tagging of H2B and H4 histones in response to spatial memory formation, we wanted to see whether this could extend to other forms of hippocampus-dependent learning and memory. Contextual fear conditioning is one of the most widely used tests to study memory processes, and a few studies have reported histone modifications during fear conditioning consolidation. H3 histone acetylation was consistently found up-regulated in the rat hippocampus after a contextual fear conditioning (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2007; Peleg et al., 2010). Moreover, this activation was dependent on the activation of NMDA receptors (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2007). H4 histone acetylation was reported unchanged in early studies (Levenson et al., 2004), whereas it was found increased in more recent ones (Francis et al., 2009; Peleg et al., 2010). H2B has never been investigated in this type of memory.

We thus analyzed histone acetylation of H2B, H4 and H3 in rats trained for fear conditioning, and to compare it, in addition to the home cage (HC) group, to two additional control groups (Figure 3A). The context plus shock group (CS) received 3 shocks at random time points within the 8-min training period, the context-only group (CX) did not receive any shock and were simply left wandering in the context, and the immediate-shock group (IS) received three consecutive shocks in the context at the start of the training and were then left in the context for 8 shock-free min (Figure 3A). Rats from the HC group never experienced the context. Rats from each groups ($n=6$ /group) were euthanized one hour after the training

and hippocampal tissues were collected for histone acetylation level measurements, while freezing was tested during a probe test given after a 24-h delay in the other rats (n=10/group). As shown in figure 3B, only rats of the Context-Shock group exhibited conditioned freezing to the context after this delay. Freezing levels were very low and similar in the two other groups. The ANOVA showed a significant effect of “Training condition” [$F_{(1,27)} = 112,28$ $P < 0.0001$] and the post hoc comparisons indicated that the Context-Shock group significantly differed from both the Context and the Immediate-Shock groups ($p < 0.001$ in each case), which did not differ significantly from each other.

Histone acetylation levels measured by immunoblotting in the hippocampus of these rats are shown on figure 3C. When fear conditioned rats (CS) were compared to home-cage rats (HC), all three histones (H2B, H3 and H4) displayed a significant increase in acetylation (H2BK5, 2.35 fold, $p < 0,001$; tetra-Ac, 1.42-fold, $p < 0,05$; H3K9K14, 1.52 fold, $p < 0.05$; H4K12, 1.74 fold, $p < 0.01$). Nevertheless, histones were differentially responsive to the controls. Particularly, H3 histone acetylation was significantly increased in both the CX (1.3 fold, $p < 0.05$) and the IS (1.42 fold, $p < 0.05$) control groups when compared to the HC group. H2B acetylation showed a non significant trend to increase in response to IS (H2B tetra-Ac, 1.22 fold, $p = 0.163$; H2BK5, 1.34 fold, $p = 0.052$), while H4K12 acetylation remained unresponsive to the CX or IS conditions. Altogether, and as was also the case in the water maze test, these analyses suggest that H2B and H4 acetylation are increased when shocks are paired with the context and training produces learnt fear, whereas the increased H3 acetylation appears less specific to the establishment of such a context-shock association.

Discussion

We recently identified H2B acetylation as a major chromatin mark associated with plasticity/memory gene promoters in the hippocampus of rats which had learnt a spatial reference memory task over three consecutive days (Bousiges et al., 2010). In the current report, we describe that this chromatin mark **i)** can be finely tuned by NMDA receptor activation in primary neurons, and **ii)** is consistently activated in response to learning engaging the hippocampus (spatial memory or contextual fear conditioning). We also report that the H4K12 acetylation pattern follows that of H2B in both behavioral tasks. Finally, we confirm that H3 acetylation seems more sensitive to manipulations of the rats environmental context in the Morris water maze and we extend this observation to contextual fear memory formation. Our data thus suggest that H2B acetylation could be an essential mediator of NMDA receptor-dependent long lasting events supporting hippocampus-dependent memory formation. They also emphasize that acetylation of specific histones depends on the type of information to be stored, suggesting a histone code in response to behavior/environment. That these changes were detectable at a global level in the hippocampus might reflect that, in addition to a gene locus-specific opening, a general opening state of the chromatin could be driven by behavior-dependent receptor activation.

NMDA receptor-mediated activation of histone acetylation

The H3 histone is known to be a target of NMDA and ERK-dependent signaling in hippocampal neurons (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2007; Tian et al., 2009; Tian et al., 2010). Our results show that NMDA activated H3 histone acetylation in a concentration-dependent manner in cerebellar neurons. However, the impact of NMDA activation on H2B acetylation has never been investigated previously. In this report, we evidenced that sustained NMDA treatment exerts a fine tuning on H2B acetylation in neuronal cultures. At both concentrations (50 μ M and 150 μ M) NMDA receptor activation first down-regulated H2B histone acetylation, suggesting the activation of HDAC and/or blockade of HAT activities. Interestingly, at later time points, only the lowest of the two concentrations (50 μ M) of NMDA increased H2B acetylation. This may reflect that in a second step, low NMDA receptor activation rather lead to reduced HDAC/increased HAT activity, a process not achieved with higher NMDA concentrations. Genomic responses initiated by NMDA receptors are critically dependent on whether synaptically or extrasynaptically located receptors are stimulated. Thus, an interesting hypothesis for this differential effect could be that 50 μ M NMDA mainly activated synaptic NMDA receptors, while at the concentration of 150 μ M, extra-synaptic NMDA receptors may have been activated in addition (reviewed in Hardingham and Bading, 2010). This was shown to result in opposing actions on intracellular signaling pathways (especially that of CREB/CBP), thus providing a molecular basis for differences in gene expression leading to neuroprotective (synaptic) or death-promoting (extra-synaptic) pathways (Papadia et al., 2005; Hardingham and Bading, 2010). In our experimental conditions, no neuronal death was measured 24h after 150 μ M NMDA treatment (data not

shown), but it is likely that this NMDA concentration might be more deleterious than 50 μ M in cerebellar granule neurons. Primary hippocampal cultures display different sensitivities to NMDA concentrations (Soriano et al., 2006) and how these NMDA-dependent acetylation regulations occur in other neuronal types remains to be established. Nevertheless, acetylation of H2B could represent a key control point that regulates specific genomic programs in response to low and high concentrations of NMDA treatment. Whether some genes are more responsive to H3 and/or H2B acetylation remains to be established by chromatin immunoprecipitation experiments.

In terms of possible mechanisms, NMDA receptor-induced signaling could impact on the lysine of both histone tails (H3 and H2B), and do so in separate ways regardless of the NMDA concentration. However, H3 acetylation occurred before H2B acetylation (at both NMDA concentrations) in granule neurons, suggesting a model in which the H3 acetylation levels reached within nucleosomes could be a « necessary » event permitting subsequent acetylation of H2B. Regulatory cross-talks between different histone post-translational modifications represent the basis of the histone code hypothesis (Latham and Dent, 2007; Wang et al., 2008; Tweedie-Cullen et al., 2009; Ajiro et al., 2010) and our data further emphasize that such cross-talks could also depend on the post-translational modification strength (level of acetylation) and duration (kinetics). Overall, our *in vitro* results point to a regulation by which NMDA receptor-mediated signaling could trigger a specific nuclear response through integration of differential histone H3/H2B acetylation at the level of the chromatin structure.

H2B and H4 histones acetylation as a marker of long-term memory storage

A remarkable result presented herein is that the H2B and H4 N-terminal histone tails were consistently found to be hyperacetylated in the hippocampus of rats subjected to a training leading to memory formation (for the location of the platform hidden in the water maze or for context-associated shocks in the fear conditioning paradigm). Thus, these histone marks (H2BK5, tetra acetylated-H2B and H4K12) could represent a specific molecular substrate of memory formation. Surprisingly, increased acetylation levels were readily observed at an early time point of training (1 h after the first day, of Morris water maze training, 1h after the administration of shocks paired to the context), suggesting that learning-triggered modifications of the chromatin structure are early events.

A link between changes in H2B acetylation and memory formation has been reported in the literature, but on the basis of indirect arguments: increased levels of H2B acetylation (as well as other histones) have been evidenced in the hippocampus of HDAC2 knock-out mice (Guan et al., 2009) and in mice in which the nuclear pool of PP1 was inhibited (NIPPI mice) (Koshibu et al., 2009); in both mice models enhanced long term potentiation (LTP) and improved memory functions were found. In addition, based on our *in vitro* observations, we report here that H2B acetylation undergoes a fine tuning in response to NMDA receptor activation, a major component of LTP and memory formation. H2B acetylation can also be rapidly triggered by depolarization in hippocampal slices (Maharana et al., 2010). Altogether,

these data suggest that H2B acetylation could represent an early subcellular step of memory formation, potentially triggering the transcription of specific genes related to memory consolidation. We have previously reported that acetylated-H2B histones were enriched at specific promoters such as that of *bdnf* exon IV, *cFos* and *egr-1* (*zif268*) (Bousiges et al., 2010), suggesting that genetic programs associated with plasticity or memory can represent acetylated-H2B target genes. Noteworthy, H2B is itself the preferred histone target of CBP in the hippocampus, as demonstrated in *cbp*^{+/-} mice (Korzus et al., 2004), in conditional *cbp* KO mice (Chen et al., 2010; Valor et al., 2011), or in a recent study in which CBP inactivation was achieved by focal homozygous knockout of CBP (Barrett et al., 2011). Compared to other acetyltransferases, CBP has an important role in memory formation and consolidation as CBP knock down impacts several forms of short- and long-term memory formation (reviewed in Barrett and Wood, 2008; Chen et al., 2010; Barrett et al., 2011; Valor et al., 2011). Moreover, we previously reported that CBP itself was up-regulated during spatial learning, while its promoter was enriched in acetylated-H2B histone (Bousiges et al., 2010), emphasizing a positive feedback loop of CBP on its transcriptional activation through acetylation of H2B in the hippocampus. Thus, CBP-induced acetylation of H2B might be a mean to activate specific plasticity/memory-related gene transcription. CBP-dependent transcription has also been described as an important mediator of the positive effects of environmental enrichment on memory formation (Lopez-Atalaya et al., 2011). More precisely, H2B histone acetylation was consistently found at the promoters of neurogenesis-related genes (Lopez-Atalaya et al., 2011), and neurogenesis participates in the behavioral ameliorations of environmental enrichment (Nithianantharajah and Hannan, 2009). Future studies using ChIP-sequencing will certainly help to identify and characterize acetylated H2B-regulated genetic programs in the hippocampus during memory formation.

Acetylation of H4 histones has been more widely studied and its association with memory formation is documented. It is increased in the hippocampus after fear conditioning (Francis et al., 2009; Peleg et al., 2010), latent inhibition training (Levenson et al., 2004) and spatial memory formation (Bousiges et al., 2010). In terms of associated genetic programs, enrichment of acetylated-H4 has been shown on different *bdnf* promoters in response to fear conditioning in the hippocampus (Fuchikami et al., 2009; Peleg et al., 2010; Takei et al., 2011), in the frontal cortex (Bredy et al., 2007) or in the amygdala (Ou and Gean, 2007), and our recent data show an enhancement of acetylated H4 on *cFos*, and *zif268* proximal promoters in the hippocampus during spatial memory training (Bousiges et al., 2010). A recent study remarkably showed that H4K12 acetylation was altered by aging in mice subjected to fear conditioning (Peleg et al., 2010). Histone H4 acetylation might also be involved in Alzheimer's disease (AD) pathology as it is reduced in transgenic models of this disease (Francis et al., 2009; Ricobaraza et al., 2009; Kilgore et al., 2010). Furthermore, acetylated H4K12 associated genetic programs were recently documented when Fischer's group achieved ChIP-sequencing in the hippocampus on this histone mark during fear learning (Peleg et al., 2010). Thus, the study presented here further emphasizes that this epigenetic mark is specific to memory formation as it is consistently induced in hippocampus-dependent learning paradigms, but not in the different control situations used.

H3 histone acetylation as a marker of contextual changes

Another interesting result is that H3 was found to be significantly acetylated in the hippocampus of rats subjected to learning, but the same holds true for rats exposed to other control situations compared to naive home cage rats. H3K14 acetylation is known to be induced in the hippocampus of animals undergoing shocks paired to the context (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006; Chwang et al., 2007). However, in all these studies, tissue collected in learners was compared to tissue from naive controls or from animals exposed to unpaired shocks. These two control situations, however, were never compared to each other. In a previous study on spatial memory consolidation, we established that H3 acetylation measured in the hippocampus of control rats swimming to a visible platform in the Morris Water Maze was increased in comparison to naive rats, but was in fact also similar to that of rats having been trained for 3 days to learn the location of a hidden platform (Bousiges et al., 2010). Herein, we show that this is also the case right after the first training session, suggesting the high responsiveness of this histone mark. In addition, in the fear conditioning paradigm, both context (CX) and immediate shock (IS) rat groups also presented significantly higher H3 acetylation levels in their hippocampus vs. that of naive rats, indicating that a « new » situation, even when not associated with learning, is able to modify this epigenetic mark. This finding suggests that certain acetyltransferases can be rapidly activated in the hippocampus of animals placed in a novel situation, acetylate K9 and/or K14 of H3 histone in the nucleus, thereby opening the chromatin and favoring gene transcription independently of memory formation. One good candidate gene is the *bdnf* gene which is regulated by several different promoters (Aid et al., 2007). Contextual fear learning was reported to induce *bdnf* mRNA in the CA1 area of the hippocampus in a context plus shock situation, but also during exposure to context only (Lubin et al., 2008). The authors further demonstrated an exon-specific *bdnf* mRNA regulation, *bdnf* exon I being activated in the context-only situation, whereas *bdnf* exon IV was more specifically activated when the context was paired to shocks (Lubin et al., 2008). It is noteworthy that *bdnf* exon I transcripts in the hippocampus are very responsive to a HDAC inhibitor directly modulating histone acetylation levels (Tian et al., 2009). Thus, it is likely that acute changes in usual situations, either mild, such as having to wander in a novel environment when having been taken out from the home cage, or strong, such as having to experience unpaired shocks or swimming towards a visible escape platform, impact H3 histone acetylation, whereby the chromatin structure can be modified and specific gene profiles regulated. Which genetic programs are indeed activated in response to these conditions remains to be established, but they should definitely depend on how stressful and/or novel environmental changes may be. We suggest that the prime response to changes in the environment could be mediated by the rapid acetylation of H3 histone that would open access to a panel of genes more responsive to this histone mark. Together, it could also pre-open the chromatin structure of other genes, responsive to the acetylation of other histones (e.g. H2B).

In summary, our data suggest an activation code on histones, in which H3 would be the most sensitive to changes of environmental conditions and H2B/H4 the most sensitive to memory formation. Noteworthy, H2B- and H3-dependent acetylation could be finely regulated, at least in part, by NMDA receptor activation, as shown *in vitro*. Whether they are dependent on each other to maintain long-lasting events remains an open question. Our results also provide indirect support to the exciting perspective of treating cognitive alterations by a pharmacological action on acetylation or deacetylation of histones. Inhibitors of histone deacetylation (HDAC) are under intense investigation and were already shown to reduce neurodegeneration-related memory impairments in animal models (Fischer et al. 2010; Selvi et al., 2010; Stilling and Fischer, 2011). HDAC inhibitors, however, often have a large spectrum of action (Marks and Xu, 2009), thereby increasing the risk of unwanted effects. Thus, given the herein reported data, developing molecules targeting more specifically H2B and H4 histones, be it by the way of a direct activation of HATs (Selvi et al., 2010), appears as a relevant aim.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by CNRS (UMR7237, JCC), INSERM (U692, JPL), University of Strasbourg (UMR7237, JCC) and granted by associations that we warmly thank: FRM-Alsace (to JCC and ALB), Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer (LECMA project #10702 to ALB), Alsace Alzheimer 67 (to ALB and Dr. F. Blanc [FB]), as well as France Alzheimer Haut-Rhin (to JCC). OB received salary support from the LECMA (#10702 to ALB), FORNASEP (to FB, HUS, Strasbourg, France), and he is currently supported by an AHU fellowship (plan Alzheimer 2011-2013). RN and MAM were recipients of a doctoral fellowship from the French government, and RN received additional salary support from the LECMA (#10702 to ALB). AS is currently supported by the Fondation Unistra-Pierre Fabre. The authors are grateful to O Bildstein, D Egesi, and G Edomwonyi (UMR 7237) for their assistance in animal care, and to MJ Ruivo (U692), as well as B Cosquer, K Herbeaux and MM Klein (UMR 7237) for their technical assistance.

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.
- Ajiro K, Scoltock AB, Smith LK, Ashasima M, Cidlowski JA (2010). Reciprocal epigenetic modification of histone H2B occurs in chromatin during apoptosis in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* **17**:984-993.
- 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.
- Barrett RM, Malvaez M, Kramar E, Matheos DP, Arrizon A, Cabrera SM, Lynch G, Greene RW, Wood MA (2011). Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. *Neuropsychopharmacology* **36**:1545-1556.
- Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL (2010). Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **35**:2521-2537.
- Boutillier AL, Trinh E, Loeffler JP (2003). Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis. *J Neurochem* **84**:814-828.
- 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.
- Chandramohan Y, Droste SK, Reul JM (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.
- Chen G, Zou X, Watanabe H, van Deursen JM, Shen J (2010). CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *J Neurosci* **30**:13066-13077.
- Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* **13**:322-328.

- Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci* **27**:12732-12742.
- Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, 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.
- D'Mello SR, Aglieco F, Roberts MR, Borodezt K, Haycock JW (1998). A DEVD-inhibited caspase other than CPP32 is involved in the commitment of cerebellar granule neurons to apoptosis induced by K⁺ deprivation. *J Neurochem* **70**:1809-1818.
- Fischer A, Sananbenesi F, Mungenast A, Tsai LH (2010). Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol Sci* **31**:605-617.
- Francis YI, Fa M, Ashraf H, Zhang H, Staniszewski A, Latchman DS, Arancio O (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **18**:131-139.
- Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, Yamamoto S, Yamawaki S (2009). Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**:73-82.
- Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* **91**:603-649.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**:55-60.
- Hardingham GE, Bading H (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* **11**:682-696.
- Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G (2010). Inhibitors of class 1 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.
- Koshibu K, Graff J, Beullens M, Heitz FD, Berchtold D, Russig H, Farinelli M, Bollen M, Mansuy IM (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* **29**:13079-13089.
- Kramer D, Minichiello L (2010). Cell culture of primary cerebellar granule cells. *Methods Mol Biol* **633**:233-239.

- Latham JA, Dent SY (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**:1017-1024.
- Levenson JM, Sweatt JD (2006). Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol Life Sci* **63**:1009-1016.
- 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.
- Lopez-Atalaya JP, Ciccarelli A, Viosca J, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Canals S, Giustetto M, Barco A (2011). CBP is required for environmental enrichment-induced neurogenesis and cognitive enhancement. *EMBO J* **30**:4287-4298.
- 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.
- Marchand AR, Luck D, DiScala G (2003). Evaluation of an improved automated analysis of freezing behaviour in rats and its use in trace fear conditioning. *J Neurosci Methods* **126**:145-153.
- Marks PA, Xu WS (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* **107**:600-608.
- Morgado-Bernal I (2011). Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* **176**:12-19.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* **89**:369-382.
- Ou LC, Gean PW (2007). Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol* **72**:350-358.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* **25**:4279-4287.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**:753-756.
- Reul JM, Chandramohan Y (2007). Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation. *Psychoneuroendocrinology* **32** Suppl 1:S21-25.

- Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mecinas MG (2009). Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* **4**:434-439.
- 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.
- Selvi BR, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL (2010). Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1799**:840-853.
- Sharma SK (2010). Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. *Neurosci Biobehav Rev* **34**:1234-1240.
- Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2006). Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci* **26**:4509-4518.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9447-9452.
- Stilling RM, Fischer A (2011). The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* **96**:19-26.
- Takei S, Morinobu S, Yamamoto S, Fuchikami M, Matsumoto T, Yamawaki S (2011). Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* **45**:460-468.
- Tian F, Marini AM, Lipsky RH (2010). NMDA receptor activation induces differential epigenetic modification of Bdnf promoters in hippocampal neurons. *Amino Acids* **38**:1067-1074.
- Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, Lipsky RH (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.
- Tweedie-Cullen RY, Reck JM, Mansuy IM (2009). Comprehensive mapping of post-translational modifications on synaptic, nuclear, and histone proteins in the adult mouse brain. *J Proteome Res* **8**:4966-4982.
- Valor LM, Pulpulos MM, Jimenez-Minchan M, Olivares R, Lutz B, 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.

Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**:897-903.

Figure 1: Time course of H2B and H3 histone acetylation modulation upon increased NMDA receptor activation in primary neurons.

(A) Time course of histone acetylation upon 50 μ M and 150 μ M NMDA treatment. Acetylated and total histone levels were assessed by western blot performed on total extracts of cerebellar granule neurons (CGN) maintained in primary culture for 6 days. Three groups were compared: non-treated controls versus 50 μ M or 150 μ M NMDA-treated cells at three different time-points (1h, 4h and 8h). Bands (n=4) were quantified and typical bands are shown in duplicates. Acetylated-histones were normalized relative to total histones. Non-treated controls (Ct) are arbitrarily set at 100% and results are presented as percentage of control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 when compared to the control group, or to another group as noted. *(B) Schematic representation of histone H3 and H2B acetylation level kinetics* obtained with 50 and 150 μ M NMDA treatment in A and B; Y-scale corresponds to the fold induction of the acetylated/total ratio for each histone. Note that NMDA receptor activation differentially regulates H3 and H2B acetylation levels with time.

Figure 2: Short spatial memory training differentially modulates H2B, H4 and H3 histone acetylation in the rat hippocampus

(A) Performance of rats trained for spatial reference memory during one or three consecutive days in the Morris Water Maze. Acquisition data, expressed as the mean distances (+ SEM) to reach the platform, are presented on the left panel. Learning rats searched the location of a hidden platform (HPf) at a fixed position. Controls rats swam to a visible platform (VPf) whose location was changed from trial to trial. Probe trial performances are presented for 1- and 3- day training (right panel), as the mean time (+ SEM) spent in the target quadrant. Performance is significantly above chance (i.e., 15 s) after 3 days of training, *p<0.05. *(B) Comparison of acetylated and total histone levels* between home cage rats (HC, n=5), rats trained with a visible platform (VPf, n=5) and rats trained with a hidden platform (HPf, n=5) in a single daily session. Acetylation levels were measured by western blot performed on total extracts from dorsal hippocampus with specific antibodies (Tetra Ac: H2BK5K12K15K20, K5Ac: H2BK5, H4K12 and H3K9K14). Typical western blots are presented in duplicates on the left. Quantifications are shown on the right. Ratios of acetylated/total histone corresponding to the home cage rats (HC) were arbitrarily set at 100%. Student t test: ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, when compared to the HC group or as noted. Both H2B and H4 histones showed hyperacetylation in the learning group (HPf) compared to the control groups (VPf and HC), while H3 was hyperacetylated in the VPf and HPf groups, thus more reflecting task-context processing.

Figure 3: Impact of contextual fear conditioning on histone acetylation in the rat hippocampus as compared to different control situations

(A) *Experimental design.* Three groups of rats (n=16/group) were performed: one group remained in the context with no shock (CX), one received three immediate and consecutive shocks and were left in the context for 8 min (IS) and the last one received three randomly-distributed shocks in the context as noted (CS). Animals (n=10/group) were then either tested for their freezing behavior after 24h (B; n = 10/group) or euthanized after 1h for tissue collection (dorsal hippocampus) and western blot analyses of acetylated histones (C; n = 6/group). Note that a marked freezing behavior is observed only in the Context-shock group (CS), demonstrating that rats of this group were the only ones having associated the shock with the context. (C) In the biochemical studies, all three groups were compared to their counterparts taken from the home cage (HC, n=6). Lysine acetylations measured were H2BK5 (K5Ac, plain histograms), H2BK5K12K15K20 (Tetra Ac, stripped histograms), H4K12 (K12Ac) and H3K9K14 (K9K14Ac). Typical western blots are shown in duplicates. Quantified results are represented as fold induction of the Acetylated/total ratio for each histone, the ratio obtained in the HC condition being arbitrarily set at 100%. Student's *t-test*: ***p<0.001**p<0.01, *p<0.05, as compared to HC group. Global H2B and H4 histone acetylation levels were clearly increased in the fear learning group (CS) as compared to the other situations, while H3 acetylation levels were increased in CS and both CX and IS controls compared to rats that were completely naive to the testing situation (HC).

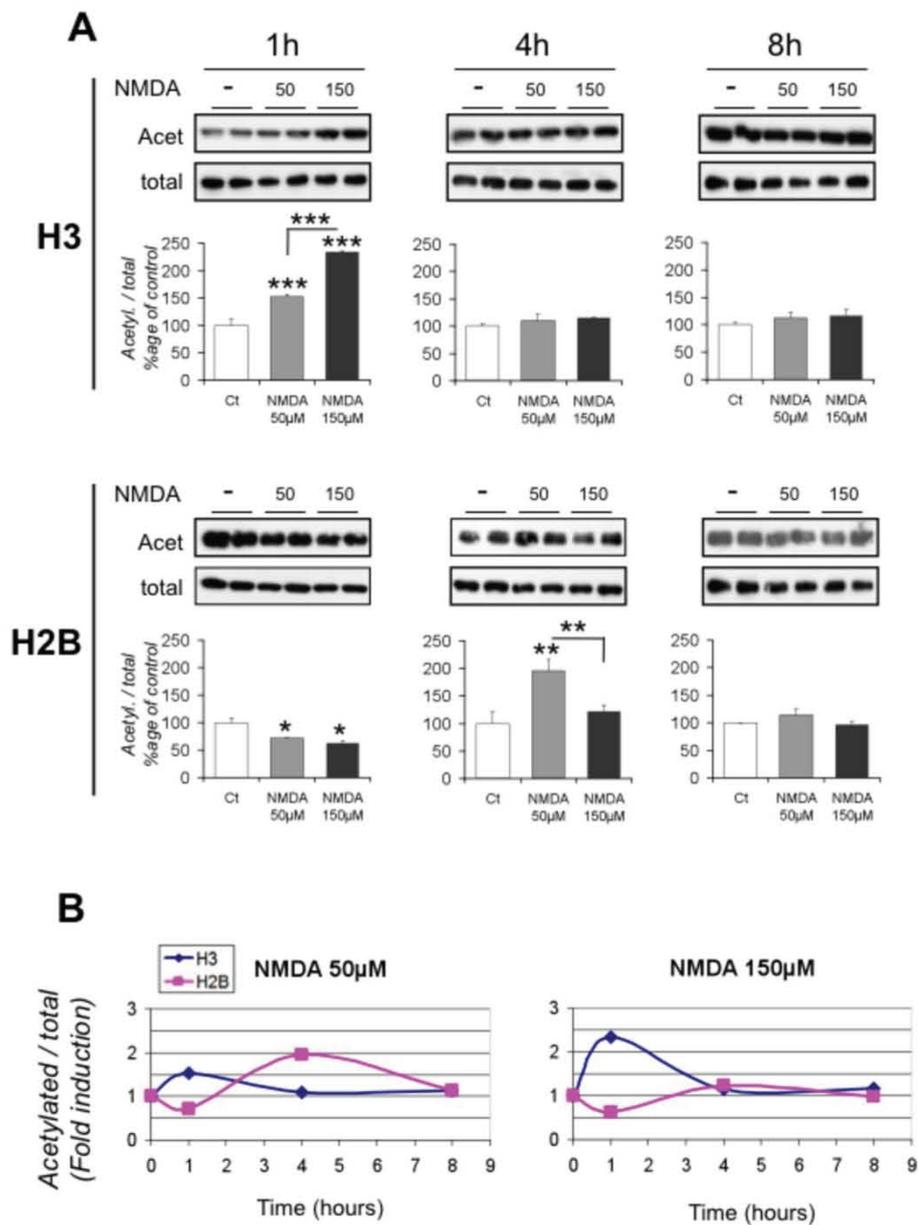


Figure 1: Time course of H2B and H3 histone acetylation modulation upon increased NMDA receptor activation in primary neurons.

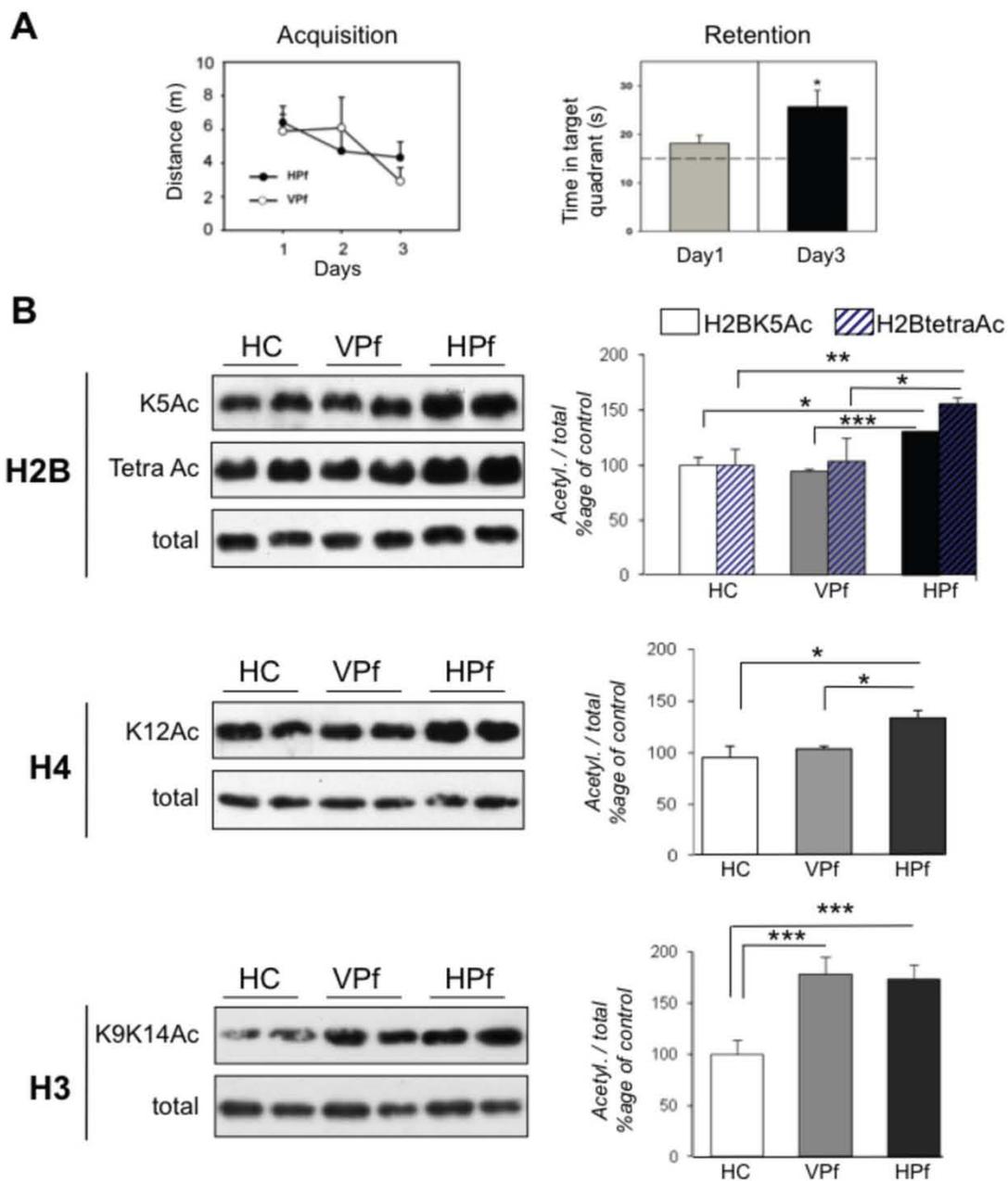


Figure 2: Short spatial memory training differentially modulates histone acetylation in the rat hippocampus

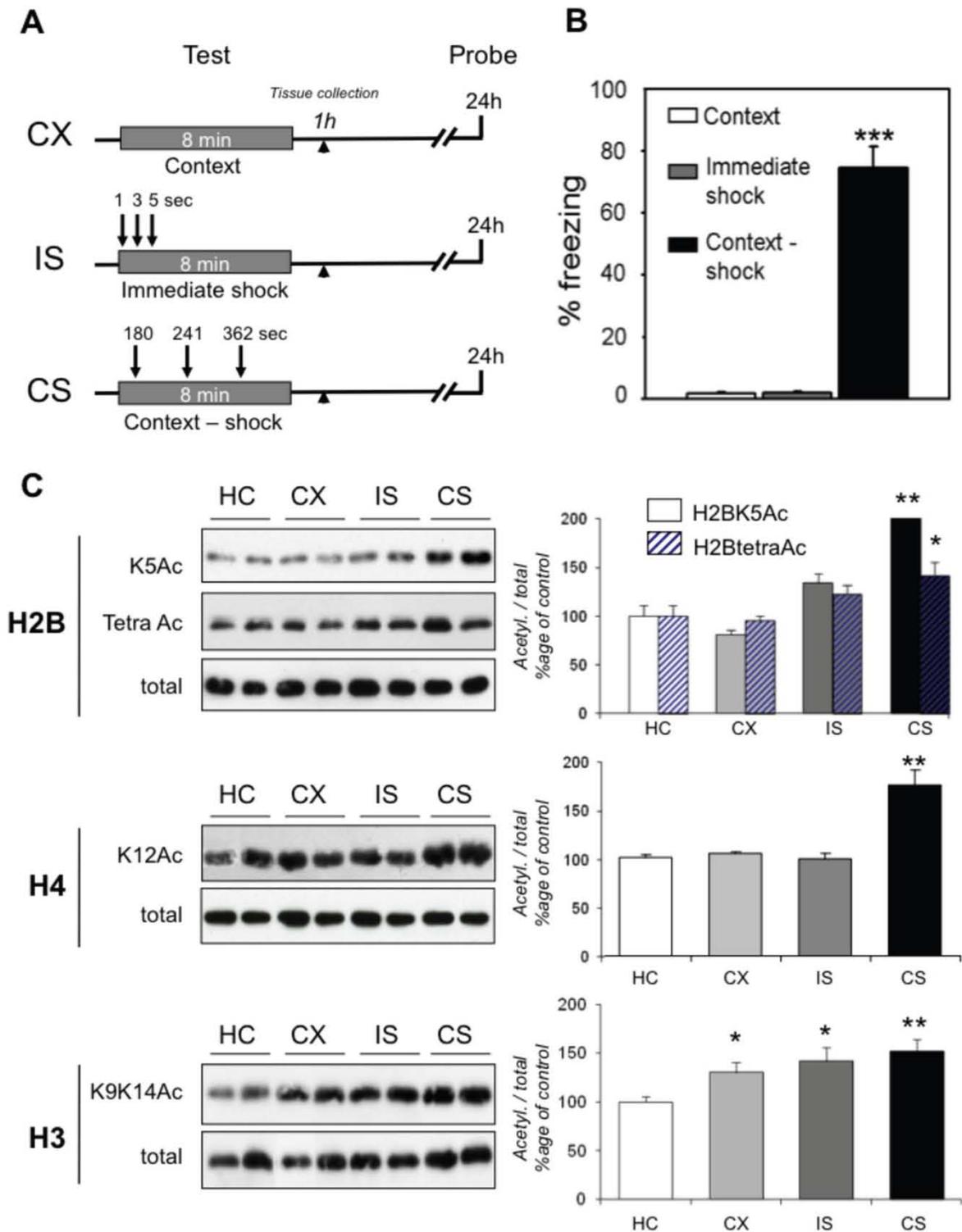


Figure 3: Impact of contextual fear conditioning on histone acetylation in the rat hippocampus compared to different control situations

Conclusion

Nos données *in vitro* confirment tout d'abord l'implication différentielle de l'acétylation des histones H2B et H3 dans les processus sous-tendant la consolidation des souvenirs (article 1 : Bousiges et coll., 2010). En effet, l'activation des récepteurs NMDA, évènement nécessaire à la mise en jeu des cascades intracellulaires impliquées dans la consolidation, induit une régulation précise et différentielle de l'acétylation de H3 (H3K9K14) et de H2B (H2BtetraK ou K5) dans des cultures primaires de neurones glutamatergiques. Cette régulation spécifique dépend à la fois du délai post-traitement et de la dose de NMDA utilisée. On note une augmentation rapide (1h) de l'acétylation de l'histone H3 suite au traitement NMDA, suivie d'un retour au niveau de base 4h après l'activation des récepteurs, et ce quelque soit la dose de NMDA utilisée (50 μ M et 150 μ M). Au contraire, une diminution rapide des niveaux d'acétylation de l'histone H2B est observée 1h après le traitement au NMDA (50 μ M et 150 μ M). Celle-ci est suivie d'une hyperacétylation marquée de H2B 4h après le traitement à la concentration la plus faible (50 μ M), puis d'un retour au niveau de base à 8h. Pour le traitement à la concentration la plus élevée, l'hypoacétylation de H2B observée 1h après le traitement est par contre suivie d'un retour au niveau de base 4h après le traitement. Ces régulations précises et spécifiques de chacune de ces histones se traduisent certainement par une régulation fine de la transcription, susceptible de jouer un rôle crucial dans les mécanismes de plasticité synaptique et de mémoire.

Cette régulation différentielle de l'acétylation des histones H2B et H3, tout comme celle de H4, a également été mise en évidence dans l'hippocampe dorsal de rats suite à un apprentissage dépendant de l'hippocampe.

Quelque soit la tâche utilisée (MWM ou CFC), on note une hyperacétylation des histones H2B et H4 dans l'hippocampe dorsal des rats soumis à l'apprentissage (groupe HPf pour le MWM ; groupe CS pour le CFC) en comparaison aux différents groupes contrôles, que ce soient les groupes de rats soumis aux dispositifs expérimentaux (VPf pour le MWM ; CX et IS pour le CFC) ou les groupes de rats naïfs (HC). Ceci indique que les acétylations des histones H2B et H4 sont spécifiquement induites par un apprentissage dépendant de l'hippocampe, et ce peu importe la tâche utilisée. Ces modifications épigénétiques

particulières (H2BK5, H2B tetra acétylées et H4K12) détectées par une analyse globale (totalité de l'hippocampe dorsal) pourraient donc constituer des marqueurs moléculaires spécifiques de la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe.

L'acétylation de l'histone H3 est également augmentée dans l'hippocampe dorsal des rats soumis à l'apprentissage (groupe HPf pour le MWM ; groupe CS pour le CFC) par rapport aux rats naïfs (groupes HC). Cependant, de manière intéressante, une induction du même ordre est déjà observée lorsque l'on compare les groupes contrôles exposés aux dispositifs expérimentaux (VPf pour le MWM ; CX et IS pour le CFC) aux groupes de rats HC. Par conséquent, l'induction d'acétylation de H3 observée dans les groupes apprentissage (HPf et CS) serait en partie due aux effets liés à l'exposition aux dispositifs expérimentaux. Cette marque s'avère donc sensible aux différentes stimulations associées au dispositif expérimental indépendamment du fait que l'animal apprenne la tâche.

En résumé, l'acétylation de H3 est plus sensible aux divers changements liés au contexte environnemental alors que les acétylations des histones H2B et H4 sont impliquées de manière plus spécifique dans la consolidation de la mémoire. Ces données suggèrent une régulation différentielle de l'acétylation de ces différentes histones en fonction du type d'information à traiter. L'acétylation de H3 pourrait être un pré-requis nécessaire entraînant un premier degré d'ouverture de la chromatine, qui permettrait ensuite la mise en place d'autres marques, spécifiques de l'apprentissage, comme les acétylations de H2B et H4. Celles-ci favoriseraient alors l'activation de programmes transcriptionnels nécessaires à la consolidation des souvenirs dépendants de l'hippocampe.

DISCUSSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I- Comment interpréter le ‘langage’ de la chromatine ?

1. Quelles histones ? Dans quel but ?

L'ensemble de nos travaux souligne l'implication spécifique et différentielle de l'acétylation des histones H2B, H4 et H3 en fonction du type d'information à traiter. L'acétylation des histones H2B et H4 au niveau de sites particuliers (H2BK5, H2B tetra acétylées (H2BK5K12K15K20) et H4K12) est spécifiquement induite dans l'hippocampe dorsal en réponse à un apprentissage et participe ainsi, *via* la transcription de gènes, à la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe. Au contraire, les changements d'acétylation de l'histone H3 (H3K9/14) sont eux plus sensibles au contexte environnemental et favorisent de ce fait l'adaptation de l'animal à son environnement.

L'acétylation de l'histone H3 est un pré-requis favorable au processus de consolidation des souvenirs.

Nous avons observé une hyperacétylation de l'histone H3 (H3K9/K14) dès lors que les animaux sont exposés au dispositif expérimental, que ce soit dans le MWM ou dans la boîte de CFC (articles 1 et 3). L'acétylation de H3 est également induite suite à une exposition à un

contexte environnemental riche et complexe, l'EE, par rapport à des conditions de stabulation standard (article 2). L'acétylation de H3 peut donc être rapidement induite par l'exposition au contexte environnemental.

Que ce soit dans les dispositifs expérimentaux ou dans les conditions d'élevage en EE, différents stimuli sont liés au contexte environnemental. En effet, plusieurs facteurs sont associés à l'exposition au MWM comme la nage, l'exploration ou encore le stress par exemple. De la même manière, l'exposition à la boîte de CFC induit un stress lié au nouvel environnement et une activité exploratoire (groupe CS), mais également un stress lié au choc électrique (groupe IS). Concernant l'EE, les animaux sont exposés à la fois à des stimulations sociales, cognitives, sensorielles ou encore physiques. Les objets présents dans les cages d'enrichissement étant fréquemment changés et déplacés, ceci permet un renouvellement constant de l'environnement, ce qui induit un facteur 'nouveau' et favorise le maintien de l'activité exploratoire des animaux. L'ensemble de ces stimuli associés au contexte environnemental pourrait donc être à l'origine de l'hyperacétylation de H3.

Il a en effet été montré qu'une exposition à un nouvel environnement, induisant un stress léger (*mild stress*), entraîne des modifications post-traductionnelles de l'histone H3, comme la phosphorylation (PS10) et la phospho-acétylation (PS10-AcK14), dans le gyrus denté. Ces modifications sont associées à l'activation de la transcription de gènes répondant à l'activité neuronale, comme *c-fos* par exemple (Chandramohan et coll., 2007). Des résultats similaires sont observés suite à une exposition à un stress aigu (15 minutes de nage forcée) et sont corrélés 24h plus tard à une meilleure réponse adaptative des animaux (évaluation de l'immobilité lors du rappel du test de nage forcée) (Chandramohan et coll., 2008). De manière intéressante, l'augmentation de la phospho-acétylation de H3 observée dans l'hippocampe suite à un stress nécessite, en plus de la mise en jeu de la cascade intracellulaire issue des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), celle de la voie 'récepteurs NMDA/ERK-MAPK', impliquée dans la consolidation des souvenirs (pour revue : Mifsud et coll., 2011). Les modifications post-traductionnelles de H3 induites en réponse à un stress semblent donc être un pré-requis dans les processus de consolidation des souvenirs.

En permettant une meilleure réponse adaptative des animaux à leur environnement, les modifications post-traductionnelles de H3, comme l'acétylation (H3K9/K14), la phosphorylation (PS10) ou encore la phospho-acétylation (PS10-AcK14) de H3, pourraient de ce fait faciliter d'autres processus au sein de l'hippocampe, comme la consolidation des

souvenirs. En effet, l'acétylation de H3 par exemple, plus sensible aux différents stimuli environnementaux, pourrait permettre d'amorcer ces processus en favorisant un premier degré d'ouverture de la structure de la chromatine au niveau de certains groupes de gènes. Ceci favoriserait ensuite l'intervention d'autres modifications épigénétiques plus spécifiques de l'apprentissage, comme l'acétylation des histones H2B et H4, qui participeraient alors à l'activation de la transcription de gènes nécessaires à la consolidation de la mémoire. Il existerait donc une interaction dynamique entre les modifications post-traductionnelles des différentes histones, permettant ainsi la mise en place de programmes transcriptionnels précis impliqués dans la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe.

Ces interactions dynamiques entre les modifications post-traductionnelles des histones sont à la base d'un concept récent, qui souligne l'existence d'un 'langage' histone. Celui-ci se traduirait par des combinaisons spécifiques de modifications post-traductionnelles, qui, en interagissant avec les facteurs de transcription, détermineraient alors l'état transcriptionnel d'un gène donné (Campos et Reinberg, 2009).

Ces interactions dynamiques entre modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu au sein d'une même histone. Une modification post-traductionnelle au niveau d'une histone peut en effet favoriser le recrutement d'enzymes catalysant d'autres types de modifications, ce qui induit la mise en place d'autres marques sur cette même histone. La phosphorylation de l'histone H3 au niveau de la sérine 10 (H3S10) favorise par exemple l'acétylation de K14 (H3K14ac) (Cheung et coll., 2000 ; Lo et coll., 2000). Ces interactions dynamiques peuvent également s'effectuer entre différentes histones. Une étude a ainsi montré que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10), associée à son acétylation au niveau de K9 (H3K9), induit le recrutement d'une HAT favorisant l'acétylation de l'histone H4 au niveau de K16 (H4K16) (Zippo et coll., 2009).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, on pourrait donc imaginer que les changements d'acétylation des histones que nous avons observés dans l'hippocampe pourraient se mettre en place selon un ordre particulier. L'hyperacétylation de H3 (H3K9K14) interviendrait en premier lieu. Elle induirait alors le recrutement de HATs au niveau de gènes particuliers, favorisant ainsi l'acétylation de H4 et de H2B au niveau de ces gènes, ce qui permettrait l'activation de leur transcription et *in fine*, la consolidation des souvenirs.

Les acétylations des histones H2B et H4 constituent des marques épigénétiques spécifiquement impliquées dans la consolidation des souvenirs, *via* l'activation de programmes transcriptionnels particuliers.

Nos résultats indiquent que l'augmentation des acétylations des histones H2B et H4 est spécifiquement induite en réponse à un apprentissage dépendant de l'hippocampe, et ce dans deux tâches distinctes (MWM et CFC) (articles 1 et 3). Contrairement à l'histone H3, ces modifications épigénétiques particulières (H2BK5, H2B tetra acétylées et H4K12) sont augmentées uniquement dans l'hippocampe dorsal des rats soumis à la tâche d'apprentissage. Elles constituent donc des marqueurs moléculaires spécifiques de la consolidation de souvenirs dépendants de l'hippocampe.

Nous avons par ailleurs mis en évidence une augmentation de l'acétylation de H2B au niveau de promoteurs de gènes particuliers comme *zif268 (Egr1)* et le *bdnf-IV* (article 1), ce qui suggère que les programmes transcriptionnels impliqués dans les processus de consolidation de la mémoire spatiale incluent des gènes cibles de H2B acétylée. Afin d'identifier et de caractériser l'ensemble des programmes génétiques répondant aux changements d'acétylation de H2B, qui participeraient donc de manière active à la consolidation des souvenirs, il serait intéressant de réaliser des expériences de *ChIP-sequencing (ChIP-seq)* suite à ces deux tâches d'apprentissage. Le même type d'expérience a déjà été mené pour H4 acétylée, suite à un CFC, et a permis de mettre en évidence une multitude de gènes impliqués dans les processus de consolidation, dont la transcription est associée à l'acétylation de H4 (Peleg et coll., 2010).

Compte tenu de l'implication spécifique de l'acétylation des histones H2B et H4 dans les processus de consolidation, il serait également intéressant d'étudier les acétylations des histones H2B et H4 dans l'hippocampe des rats âgés élevés en EE. En effet, vu l'augmentation marquée de l'activité HAT globale observée dans l'hippocampe dorsal des rats âgés enrichis par rapport aux rats âgés standards (article 2), l'EE pourrait induire une augmentation de l'acétylation des histones H2B et H4, en plus de celle observée pour H3. De manière intéressante, une étude récente a mis en évidence un déficit lié à l'âge de l'induction de l'acétylation de l'histone H4 (K12) en réponse à un CFC. Les expériences de *ChIP-seq* ont par ailleurs montré que cet unique défaut d'acétylation globale observé au niveau de H4K12

contribue à la diminution d'expression d'un nombre considérable de gènes codant des protéines impliquées dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire comme la Formin2 (*Fmn 2*) et la PKC par exemple, dont la transcription est normalement induite en réponse à l'apprentissage, et pourrait de ce fait sous-tendre l'apparition des déficits mnésiques observés au cours du vieillissement (Peleg et coll., 2010). Il paraît donc particulièrement pertinent de voir si l'EE permet de contrer les effets du vieillissement en préservant l'augmentation d'acétylation de H4, mais également celle de H2B, induite en réponse à un apprentissage dépendant de l'hippocampe. En effet, celle-ci pourrait alors favoriser le maintien de la transcription de gènes impliqués dans les processus de consolidation, et contribuer ainsi de manière plus spécifique que l'acétylation de H3 à l'amélioration des capacités de mémoire spatiale observée chez nos rats âgés enrichis.

2. Plus d'acétylations d'histones pour de meilleures capacités mnésiques ?

Dans notre étude (article 2), l'apprentissage de 3 jours en MWM permet d'induire une augmentation de l'activité HAT globale dans l'hippocampe dorsal, qui se traduit notamment par une augmentation de la transcription du *bdnf* et de certains de ses transcrits (*bdnf-I* et *-IV*), et ce y compris chez les rats âgés standards. Les mécanismes d'acétylation des histones semblent donc toujours dynamiquement régulés par un apprentissage spatial chez le Rat âgé de 24 mois. Ces résultats sont plutôt surprenants compte tenu des données de la littérature. Fischer et collaborateurs (2010) ont en effet montré que le vieillissement s'accompagne d'une perte de l'induction de l'activité HAT, normalement observée en réponse au CFC, ce qui est corrélé à l'apparition des déficits mnésiques (Peleg et coll., 2010). Une étude récente a par ailleurs mis en évidence une perte de l'induction de la transcription du *bdnf* total ainsi que celle de l'exon-IV, suite à un apprentissage de type CFC, chez le Rat âgé de 24 mois (Chapman et coll., 2011). Ceci dit, nos résultats s'expliquent certainement par le fait que toutes les capacités mnésiques de nos rats âgés standards ne sont pas altérées. Nos rats âgés standards sont en effet capables d'apprendre à retrouver la plate-forme et ils présentent des performances de rappel correctes lorsque celui-ci est effectué rapidement (1h) après la fin de l'acquisition.

De manière intéressante, les rats âgés standards ne sont par contre plus capables de rappeler la localisation de la plate-forme 24h après le dernier jour d'acquisition, ce qui témoigne d'un défaut de consolidation, alors que les rats âgés enrichis le sont toujours. Or, deux différences sont observées au niveau des mécanismes d'acétylation des histones entre les rats âgés standards et enrichis, et pourraient donc expliquer les différents niveaux de performances à 24h. Tout d'abord, on note chez les rats âgés exposés à l'EE une induction plus forte de l'activité HAT globale en réponse à l'apprentissage, qui se répercute sur les niveaux d'expression du *bdnf*, à partir de son promoteur I. Il est donc possible qu'une 'bonne' consolidation des informations nécessite un certain 'seuil' d'acétylation des histones. Ce 'seuil' serait franchi chez les rats âgés enrichis grâce à l'effet additif de l'EE et de l'apprentissage, ce qui expliquerait alors leurs bonnes capacités de rétention à 24h, alors qu'il ne serait pas atteint chez les rats âgés standards, d'où leur incapacité à rappeler la localisation de la plate-forme 24h après la fin de l'acquisition. Par ailleurs, les rats âgés standards présentent une perte de l'hyperacétylation globale de H3 en réponse à l'exposition au MWM. Au contraire, l'EE permet d'induire l'augmentation de l'acétylation de H3 et celle-ci se maintient lorsque les rats âgés enrichis sont exposés au MWM. Le vieillissement entraîne donc une perte de la dynamique d'acétylation globale de H3 dans l'hippocampe dorsal en réponse au contexte environnemental, qui peut être contrée par l'EE. Compte tenu de l'implication de cette marque dans la mise en place des acétylations des histones H2B et H4 discutée précédemment (voir partie I-1 de la discussion générale), ce déficit d'acétylation de H3 observé chez les rats âgés standards pourrait induire une perturbation des capacités d'adaptation de ces animaux au dispositif expérimental et contribuer ainsi aux déficits mnésiques observés 24h après la fin de l'acquisition.

Le processus de consolidation nécessiterait donc d'une part l'implication ordonnée et précise des acétylations des différentes histones H3, H2B et H4, et d'autre part, le franchissement d'un certain 'seuil' d'acétylation.

II- Epi-thérapie, vers quelle stratégie ?

Il est clairement établi que la voie des HATs est fortement impliquée dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire. Lors du vieillissement, on note une altération de cette voie, associée à l'apparition des déficits mnésiques liés à l'âge. De manière intéressante, nous avons montré que l'induction de cette voie grâce à une exposition à un EE contribue au maintien des capacités mnésiques, normalement altérées lors du vieillissement (article 2). Il semble donc particulièrement pertinent de développer des traitements pharmacologiques susceptibles de favoriser ces mécanismes d'acétylation des histones. Deux stratégies sont envisageables. En effet, la voie des HATs peut être induite suite à l'utilisation soit de HDACi, soit d'activateurs de HATs.

1. Amélioration des capacités cognitives des rongeurs par un traitement aux inhibiteurs de HDACs

Les HDACi agissent en empêchant la déacétylation des histones. Il a plus récemment été suggéré qu'ils pourraient également favoriser l'activation et la stabilisation de certaines HATs. En effet, une étude a montré qu'un traitement à la TSA (trichostatin A) induit l'acétylation et la stabilisation de p300, une HAT impliquée dans la consolidation de la mémoire (Kim et coll., 2010).

De nombreuses études précliniques soulignent l'impact bénéfique des HDACi sur les processus de plasticité synaptique et de mémoire (pour revue : Fischer et coll., 2010). Une étude de Sweatt et collaborateurs (2004) a en effet montré qu'un traitement aux HDACi (butyrate de sodium (NaBut), TSA) permet d'améliorer d'une part, l'induction de la LTP *in vitro*, et d'autre part, les capacités de mémoire à long terme dans un test de CFC chez le Rongeur sain (Levenson et coll., 2004). Par la suite, plusieurs études ont confirmé les effets promnésiques des HDACi chez le Rongeur, et ce dans différentes tâches d'apprentissage (Vecsey et coll., 2007 ; Bredy et Barad, 2008 ; Stefanko et coll., 2009 ; Peleg et coll., 2010), et notamment dans le MWM (Fischer et coll., 2007). Il est intéressant de noter que l'hyperacétylation des histones induite par un traitement aux HDACi (NaBut) permet un rappel correct des informations, malgré un protocole d'apprentissage normalement insuffisant

pour entraîner une consolidation des informations (Stefanko et coll., 2009). Cette étude est donc cohérente avec la notion de ‘seuil’ d’acétylation des histones nécessaire à la consolidation des souvenirs, que nous avons discutée précédemment (voir partie I-2 de la discussion générale).

Les HDACi (*Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid* (SAHA), TSA) sont également capables d’induire des effets bénéfiques chez le Rongeur âgé. En effet, un traitement aux HDACi permet de préserver la plasticité synaptique (LTP) et les fonctions mnésiques, normalement altérées lors du vieillissement, et ce en restaurant la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire comme le *bdnf* (Peleg et coll., 2010 ; Zeng et coll., 2011). De manière intéressante, l’EE est donc capable de mimer les effets bénéfiques des HDACi sur les capacités mnésiques. Tout comme les HDACi, l’EE permet de contrer les effets du vieillissement en favorisant le maintien de la transcription des gènes impliqués dans la consolidation des souvenirs (article 2).

Il est enfin particulièrement important de souligner que les effets bénéfiques des HDACi sont également observés dans des conditions de vieillissement pathologique. L’efficacité des HDACi a par exemple été démontrée dans différents modèles transgéniques de la MA (Ricobaraza et coll., 2009 ; Ricobaraza et coll., 2010 ; Francis et coll., 2009 ; Kilgore et coll., 2010). Suite à un traitement à la TSA, on note en effet un maintien de la LTP, associé à une restauration des capacités de mémoire à long terme évaluées 24h après un CFC, dans un modèle double transgénique APP/PS1 (Francis et coll., 2009).

Ces résultats précliniques sont donc très encourageants dans l’optique de développer une stratégie thérapeutique visant à restaurer les déficits cognitifs liés au vieillissement normal et pathologique, d’autant plus que les HDACi présentent également des propriétés neuroprotectrices dans différents modèles de pathologies neurodégénératives. Cependant, la plupart de ces inhibiteurs sont très peu sélectifs et ciblent indifféremment plusieurs classes de HDACs en fonction du type d’inhibiteur utilisé (figure 34). Par conséquent, il semble nécessaire de les utiliser avec précaution et de mieux caractériser le rôle des différentes familles de HDACs dans le SNC, afin d’envisager le développement d’inhibiteurs plus spécifiques.

Histone subtype	Protein	Localization	Main HDAC inhibitors
Class I (Zn ⁺⁺ -dependent)	HDAC1, 2, 3, and 8	Mainly nucleus	Valproic acid, butyrate, vorinostat, trichostatin A, RGFP136 (HDAC3)
Class IIa (Zn ⁺⁺ -dependent)	HDAC4, 5, 7, and 9	Nucleus/cytoplasm	Trichostatin A, phenylbutyrate
Class IIb (Zn ⁺⁺ -dependent)	HDAC6 and 10	Mainly cytoplasm	Tubacin (HDAC6), trichostatin A
Class III (NAD ⁺ -dependent)	Sirt1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7	Nucleus/cytoplasm/Mitochondria	Nicotinamide, suramin (Sirt1 and Sirt2),
Class IV (Zn ⁺⁺ -dependent)	HDAC11	Mainly nucleus	

Figure 34 : Tableau récapitulatif des principaux inhibiteurs de HDACs utilisés (adaptée de Xu et coll., 2011).

2. Le développement d'activateurs de HATs : Vers une approche plus spécifique ?

Contrairement aux HDACs, le rôle de certaines HATs dans les processus mnésiques, et notamment celui de CBP, est largement documenté (Bousiges et coll., 2010 ; Chen et coll., 2010 ; Caccamo et coll., 2010 ; Valor et coll., 2011 ; Barrett et coll., 2011 ; pour revues : Barrett et Wood, 2008 ; Gräff et coll., 2011). Il semble donc particulièrement pertinent d'utiliser des traitements ciblant directement l'activité des HATs, et entre autres celle de CBP, afin de favoriser les mécanismes d'acétylation et de contrer ainsi l'apparition des déficits mnésiques observée au cours du vieillissement. Cette idée est renforcée par le fait que l'administration intra-hippocampique de CBP par injections virales permet d'améliorer les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale dans un modèle triple transgénique de la MA, ce qui est corrélé à une restauration de la synthèse du BDNF (Caccamo et coll., 2010). Pourtant, l'utilisation d'activateurs de HATs est actuellement peu développée, notamment du fait de leur incapacité à passer la BHE.

Cet obstacle a été contourné par le laboratoire du Dr Kundu (JNCSAR, Bangalore, India) avec lequel nous collaborons. Ils ont en effet mis au point un activateur spécifique de CBP/p300 (CTPB) couplé à des nanoparticules de carbone (*carbon sphere particle CSP*), ce qui lui permet de traverser la BHE (Selvi et coll., 2008). Des études préliminaires *in vivo* ont montré qu'un traitement chronique au CTPB entraîne une augmentation de l'acétylation globale de H3 dans l'hippocampe de rats, du même ordre que celle observée suite à un traitement au valproate (VPA : HDACi). Il induit également une augmentation de l'acétylation globale de H2B, ce qui n'est par contre pas le cas lors d'un traitement au valproate (Selvi et coll., 2010) (figure 35).

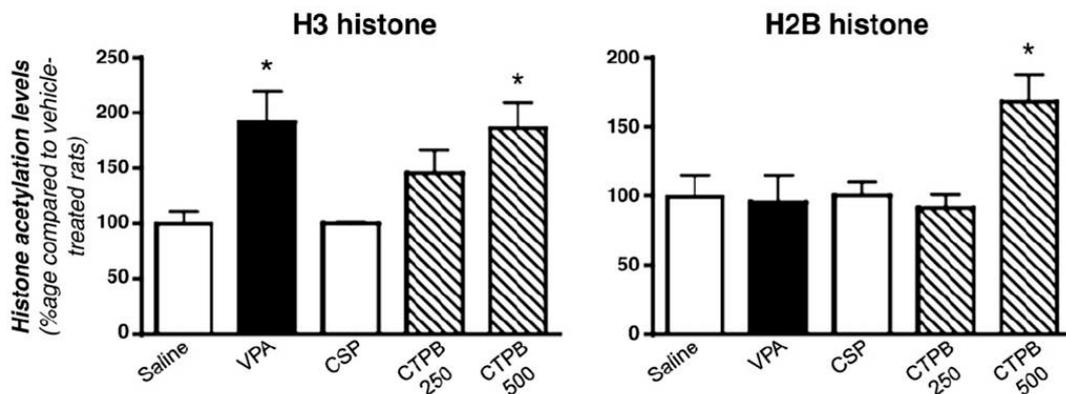


Figure 35 : Comparaison des effets des traitements au VPA (HDACi) et au CSP-CTPB (activateur de HATs) sur les niveaux d'acétylation de H3 (H3K9K14) et H2B (H2BK5K12K15K20) dans l'hippocampe dorsal de rats. Les rats (n=4/groupe) ont été sujets à des injections sous-cutanées de VPA (300mg/kg, 250 μ L) ou de tampon salin (Saline, 250 μ L : contrôle) quotidiennement pendant 4 jours consécutifs et ont été euthanasiés le 4^e jour, 3h après la dernière injection. D'autres rats ont été injectés en IP avec du CSP-CTPB (CTPB 250 ou 500 μ L) ou avec les nanosphères de carbone uniquement (CSP, 500 μ L : contrôle) et ont été euthanasiés 4 jours après l'injection. L'hippocampe dorsal a été prélevé afin de réaliser l'extraction protéique. Les niveaux d'acétylation des histones ainsi que les niveaux d'histones totales ont été évalués par *western blot*. Les histogrammes représentent le pourcentage d'induction du ratio histone acétylée/histone totale pour chaque histone par rapport aux contrôles respectifs (Saline, CSP). Student *t*-test : * p <0.05 (Selvi et coll., 2010).

Ce dernier point est particulièrement intéressant compte tenu de l'implication de l'acétylation de H2B dans la consolidation de la mémoire, que nous avons décrite dans nos études (articles 1 et 3). Des expériences sont actuellement en cours au laboratoire, afin d'étudier l'impact du traitement chronique avec ce type de molécules sur les processus de plasticité hippocampique et de mémoire.

REFERENCES

-A-

- Abraham WC (2003). How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 735-744.
- Abrous DN, Koehl M, Le MM (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* **85**: 523-569.
- Adams JP, Sweatt JD (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 135-163.
- Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD (2008). c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn Mem* **15**: 539-549.
- 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.
- Albeck DS, Backman C, Veng L, Friden P, Rose GM, Granholm A (1999). Acute application of NGF increases the firing rate of aged rat basal forebrain neurons. *Eur J Neurosci* **11**: 2291-2304.
- Alberini CM (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* **89**: 121-145.
- Albert MS, Jones K, Savage CR, Berkman L, Seeman T, Blazer D, *et al.* (1995). Predictors of cognitive change in older persons: MacArthur studies of successful aging. *Psychol Aging* **10**: 578-589.
- Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, Kuroiwa M, Plummer MR, Shors TJ, *et al.* (2003). Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* **23**: 10800-10808.
- 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.
- Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza, Pereira P, Szapiro G, *et al.* (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* **12**: 551-560.
- Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**: 319-335.
- Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO (2008). Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav* **93**: 388-394.
- Angevine JB, Jr. (1965). Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*: Suppl-70.
- Arai JA, Li S, Hartley DM, Feig LA (2009). Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment. *J Neurosci* **29**: 1496-1502.
- Arbuckle TY, Gold DP, Andres D, Schwartzman A, Chaikelson J (1992). The role of psychosocial context, age, and intelligence in memory performance of older men. *Psychol Aging* **7**: 25-36.

Arruda-Carvalho M, Sakaguchi M, Akers KG, Josselyn SA, Frankland PW. (2011) Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *J Neurosci*. **31**(42):15113-27.

Artola A, von Frijtag JC, Fermont PC, Gispen WH, Schrama LH, Kamal A, *et al.* (2006). Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **23**: 261-272.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**: 602-609.

-B-

Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, *et al.* (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5280-5285.

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**: 1853-1864.

Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* **121**: 645-657.

Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M (2006). Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. *Behav Brain Res* **169**: 231-238.

Barco A, Alarcon JM, Kandel ER (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* **108**: 689-703.

Barco A, Bailey CH, Kandel ER (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* **97**: 1520-1533.

Barco A, Marie H (2011). Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. *Mol Neurobiol* **44**: 330-349.

Barnes CA (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* **93**: 74-104.

Barnes CA (1994). Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci* **17**: 13-18.

Barnes CA, Rao G, Houston FP (2000). LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse. *Neurobiol Aging* **21**: 613-620.

Barnes CA, Suster MS, Shen J, McNaughton BL (1997). Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* **388**: 272-275.

Barrett RM, Malvaez M, Kramar E, Matheos DP, Arrizon A, Cabrera SM, *et al.* (2011). Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. *Neuropsychopharmacology* **36**: 1545-1556.

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.

Bartsch D, Casadio A, Karl KA, Serodio P, Kandel ER (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* **95**: 211-223.

REFERENCES

- Bartus RT, Dean RL, III, Beer B, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**: 408-414.
- Bear MF, Malenka RC (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* **4**: 389-399.
- Beard C, Li E, Jaenisch R (1995). Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* **9**: 2325-2334.
- 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. *Neuron* **53**: 261-277.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008) (b). BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* **14**: 147-156.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katze C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, *et al.* (2008) (a). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2711-2716.
- Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME (2003). Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* **76**: 481-486.
- Ben Menachem-Zidon O, Avital A, Ben-Menahem Y, Goshen I, Kreisel T, Shmueli EM, *et al.* (2011). Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain Behav Immun* **25**: 1008-1016.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, *et al.* (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* **20**: 1341-1347.
- Benito E, Barco A (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci* **33**: 230-240.
- Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science* **163**: 825-826.
- Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM (2006). Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol Learn Mem* **85**: 139-152.
- Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Gotz M, Canossa M (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15570-15575.
- Billard JM (2006). Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnes Res* **19**: 199-215.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**: 1203-1214.
- Bjorklund H, Dahl D (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. Comparison between peripheral glia of the anterior uvea and central glia of the retina. *J Neuroimmunol* **8**: 331-345.
- Black JC, Mosley A, Kitada T, Washburn M, Carey M (2008). The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell* **32**: 449-455.
- Blalock EM, Chen KC, Sharrow K, Herman JP, Porter NM, Foster TC, *et al.* (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* **23**: 3807-3819.

- Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31-39.
- Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK (1999). A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J Neurosci* **19**: 3535-3544.
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995). Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* **15**: 61-69.
- Bohbot VD, Jech R, Ruzicka E, Nadel L, Kalina M, Stepankova K, *et al.* (2002). Rat spatial memory tasks adapted for humans: characterization in subjects with intact brain and subjects with selective medial temporal lobe thermal lesions. *Physiol Res* **51 Suppl 1**: S49-S65.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004). Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* **25**: 333-340.
- Bordoli L, Husser S, Luthi U, Netsch M, Osmani H, 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.
- Bouet V, Freret T, Dutar P, Billard JM, Boulouard M (2011). Continuous enriched environment improves learning and memory in adult NMRI mice through theta burst-related-LTP independent mechanisms but is not efficient in advanced aged animals. *Mech Ageing Dev* **132**: 240-248.
- Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gossweiler 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 U S A* **100**: 10518-10522.
- Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, *et al.* (2010). Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **35**: 2521-2537.
- Bramham CR (2007). Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Prog Brain Res* **163**: 453-471.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* **76**: 99-125.
- Brami-Cherrier K, Lavour J, Pages C, Arthur JS, Caboche J (2007). Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* **101**: 697-708.
- Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem* **108**: 1323-1335.
- Branchi I, Karpova NN, D'Andrea I, Castren E, Alleva E (2011). Epigenetic modifications induced by early enrichment are associated with changes in timing of induction of BDNF expression. *Neurosci Lett* **495**: 168-172.
- 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.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **21**: 513-521.

Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S (2007). Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* **18**: 93-114.

Burger C, Lopez MC, Baker HV, Mandel RJ, Muzyczka N (2008). Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 379-396.

Burger C, Lopez MC, Feller JA, Baker HV, Muzyczka N, Mandel RJ (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.

Burke SN, Barnes CA (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* **7**: 30-40.

Burke SN, Barnes CA (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci* **33**: 153-161.

-C-

Caccamo A, Maldonado MA, Bokov AF, Majumder S, Oddo S (2010). 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.

Campos EI, Reinberg D (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* **43**: 559-599.

Carey N, Marques CJ, Reik W (2011). DNA demethylases: a new epigenetic frontier in drug discovery. *Drug Discov Today* **16**: 683-690.

Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci* **28**: 436-445.

Cassel JC, Lazaris A, Birthelmer A, Jackisch R (2007). Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulpiride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiol Aging* **28**: 1270-1285.

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.

Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM (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 SK, Reul JM (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.

Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J (1999). Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet* **29**: 41-46.

Chapman TR, Barrientos RM, Ahrendsen JT, Hoover JM, Maier SF, Patterson SL (2011). Aging and infection reduce expression of specific brain-derived neurotrophic factor mRNAs in hippocampus. *Neurobiol Aging* .

Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**: 1505-1509.

Chen G, Zou X, Watanabe H, van Deursen JM, Shen J (2010). CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *J Neurosci* **30**: 13066-13077.

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, *et al.* (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* **302**: 885-889.

Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**: 905-915.

Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci* **27**: 12732-12742.

Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD (2006). ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn Mem* **13**: 322-328.

Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2422-2427.

Connor JR, Diamond MC (1982). A comparison of dendritic spine number and type on pyramidal neurons of the visual cortex of old adult rats from social or isolated environments. *J Comp Neurol* **210**: 99-106.

Connor JR, Wang EC, Diamond MC (1982). Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: an environmentally induced response. *Exp Neurol* **78** : 466-470.

Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* **110**: 1321-1334.

Cotman CW, Berchtold NC (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* **25**: 295-301.

Craik FI, Rose NS (2011). Memory encoding and aging: A neurocognitive perspective. *Neurosci Biobehav Rev.*

Crick F (1984). Memory and molecular turnover. *Nature* **312**: 101.

Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, 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.

Cummins RA, Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Konstantinos T, Horsfall CR (1973). Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. *Nature* **243**: 516-518.

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* **3**: 1.

Cuppini R, Bucherelli C, Ambrogini P, Ciuffoli S, Orsini L, Ferri P, Baldi E. (2006) Age-related naturally occurring depression of hippocampal neurogenesis does not affect trace fear conditioning. *Hippocampus*.16(2):141-8.

-D-

Daffner KR (2010). Promoting successful cognitive aging: a comprehensive review. *J Alzheimers Dis* **19**: 1101-1122.

Darmopil S, Petanjek Z, Mohammed AH, Bogdanovic N (2009). Environmental enrichment alters dentate granule cell morphology in oldest-old rat. *J Cell Mol Med* **13**: 1845-1856.

- Davis S, Laroche S (2006). Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* **5 Suppl 2**: 61-72.
- 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.
- Day JJ, Sweatt JD (2010). DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci* **13**: 1319-1323.
- Day JJ, Sweatt JD (2011). Epigenetic modifications in neurons are essential for formation and storage of behavioral memory. *Neuropsychopharmacology* **36**: 357-358.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**: 737-749.
- de Toledo-Morrell L, Morrell F (1985). Electrophysiological markers of aging and memory loss in rats. *Ann N Y Acad Sci* **444**: 296-311.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* **11**: 339-350.
- Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol* **7**: 75-85.
- Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L (1972). Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J Neurobiol* **3**: 47-64.
- Diana G, Scotti de CA, Frank C, Domenici MR, Sagratella S (1994). Selective reduction of hippocampal dentate frequency potentiation in aged rats with impaired place learning. *Brain Res Bull* **35**: 107-111.
- 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.
- Diogenes MJ, Costenla AR, Lopes LV, Jeronimo-Santos A, Sousa VC, Fontinha BM, et al. (2011). Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF. *Neuropsychopharmacology* **36**: 1823-1836.
- Douglas RM, Goddard GV (1975). Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Res* **86**: 205-215.
- Drag LL, Bieliauskas LA (2010). Contemporary review 2009: cognitive aging. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **23**: 75-93.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le MM, Piazza PV, Abrous DN (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14385-14390.
- Drapeau E, Montaron MF, Aguerre S, Abrous DN (2007). Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. *J Neurosci* **27**: 6037-6044.
- Drapeau E, Nora AD (2008). Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* **7**: 569-589.
- Dravid A.R. (1993) Deficits in cholinergic enzymes and muscarinic receptors in the hippocampus and striatum of senescent rats: effect of chronic hydergine treatment. *Arch Int Pharmacodyn.* **264**, 195-202.
- Dubois, B., Tounsi, H., Michon, H., & Deweer, B. (1997). Les déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer, *Symposium en hommage à Yvon Lamour. De la neuropsychologie à la maladie d'Alzheimer* 183-197.

Dudai Y (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**: 51-86.

Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV (2001). Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* **8**: 26-34.

Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, *et al.* (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* **5**: e214.

-E-

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, *et al.* (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* **112**: 257-269.

Ellis JJ, Valencia TG, Zeng H, Roberts LD, Deaton RA, Grant SR (2003). CaM kinase II δ phosphorylation of 14-3-3 β in vascular smooth muscle cells: activation of class II HDAC repression. *Mol Cell Biochem* **242**: 153-161.

Emery CF, Huppert FA, Schein RL (1995). Relationships among age, exercise, health, and cognitive function in a British sample. *Gerontologist* **35**: 378-385.

Engert F, Bonhoeffer T (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**: 66-70.

-F-

Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**: 7-19.

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, *et al.* (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* **13**: 423-430.

Feser J, Tyler J (2011). Chromatin structure as a mediator of aging. *FEBS Lett* **585**: 2041-2048.

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* **381**: 706-709.

Finch CE (2003). Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiol Aging* **24 Suppl 1**: S123-S127.

Fischer A, Sananbenesi F, Mungenast A, Tsai LH (2010). Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. *Trends Pharmacol Sci* **31**: 605-617.

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.

Fjell AM, Walhovd KB (2010). Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. *Rev Neurosci* **21**: 187-221.

Flemming W (1878). Zur Kenntniss der Zelle und ihrer Theilungs Erscheinungen. *Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein* **3**: 23-27.

Foster TC (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev* **30**: 236-249.

- Foster TC, Gagne J, Massicotte G (1996). Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Res* **736**: 243-250.
- Foster TC, Norris CM (1997). Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* **7**: 602-612.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**: 739-749.
- Fraga MF, Esteller M (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* **23**: 413-418.
- 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.
- Fratiglioni L, Qiu C (2009). Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Exp Gerontol* **44**: 46-50.
- Freret T, Billard JM, Schumann-Bard P, Dutar P, Dauphin F, Boulouard M, *et al.* (2011). Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan. *Neurobiol Aging*.
- Freudenthal R, Romano A, Routtenberg A (2004). Transcription factor NF-kappaB activation after in vivo perforant path LTP in mouse hippocampus. *Hippocampus* **14**: 677-683.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, 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.
- Frick KM, Fernandez SM (2003). Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol Aging* **24**: 615-626.
- Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J (2003). Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Mem* **10**: 187-198.

-G-

- Gage FH, Dunnett SB, Bjorklund A (1989). Age-related impairments in spatial memory are independent of those in sensorimotor skills. *Neurobiol Aging* **10**: 347-352.
- Gallagher M, Bizon JL, Hoyt EC, Helm KA, Lund PK (2003). Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. *Exp Gerontol* **38**: 71-77.
- Gallagher M, Burwell R, Burchinal M (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* **107**: 618-626.
- Gallagher M, Burwell RD (1989). Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiol Aging* **10**: 691-708.
- Gallagher M, Rapp PR (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu Rev Psychol* **48**: 339-370.
- Gartner A, Polnau DG, Staiger V, Sciarretta C, Minichiello L, Thoenen H, *et al.* (2006). Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J Neurosci* **26**: 3496-3504.
- Giordano A, Avantaggiati ML (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* **181**: 218-230.

- Gonzalez GA, Montminy MR (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, III, *et al.* (1989). A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **337**: 749-752.
- Goodman RH, Smolik S (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**: 1553-1577.
- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, *et al.* (2010). Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* **171**: 769-778.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* **2**: 260-265.
- Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* **91**: 603-649.
- Graff J, Mansuy IM (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res* **192**: 70-87.
- Grant PA (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol* **2**: REVIEWS0003.
- Green EJ, Greenough WT, Schlumpf BE (1983). Effects of complex or isolated environments on cortical dendrites of middle-aged rats. *Brain Res* **264**: 233-240.
- Greenough WT, Hwang HM, Gorman C (1985). Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4549-4552.
- Greenough WT, Yuwiler A, Dollinger M (1973). Effects of postnatal eserine administration on learning in "enriched"- and "impoverished"-reared rats. *Behav Biol* **8**: 261-272.
- Greer ER, Diamond MC, Tang JM (1981). Increase in thickness of cerebral cortex in response to environmental enrichment in Brattleboro rats deficient in vasopressin. *Exp Neurol* **72** : 366-378.
- Gregoire S, Xiao L, Nie J, Zhang X, Xu M, Li J, *et al.* (2007). Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol* **27**: 1280-1295.
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**: 17-31.
- Gresack JE, Kerr KM, Frick KM (2007). Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. *Neurobiol Learn Mem* **88**: 393-408.
- 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.
- Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S (1995). Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9077-9081.
- 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, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, *et al.* (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**: 3993-4001.

-H-

- Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* **3**: 2083-2090.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* **3**: 533-535.
- Hallam TM, Bourtchouladze R (2006). Rubinstein-Taybi syndrome: molecular findings and therapeutic approaches to improve cognitive dysfunction. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1725-1735.
- Hara D, Miyashita T, Fukuchi M, Suzuki H, Azuma Y, Tabuchi A, *et al.* (2009). Persistent BDNF exon I-IX mRNA expression following the withdrawal of neuronal activity in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 648-653.
- Harati H, Majchrzak M, Cosquer B, Galani R, Kelche C, Cassel JC, *et al.* (2011). Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol Aging* **32**: 718-736.
- Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM (2007). Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res* **185**: 43-48.
- Hardingham GE, Chawla S, Cruzalegui FH, 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 KM, Fiala JC, Ostroff L (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 745-748.
- Hartley T, Maguire EA, Spiers HJ, Burgess N (2003). The well-worn route and the path less traveled: distinct neural bases of route following and wayfinding in humans. *Neuron* **37**: 877-888.
- Hasselmo ME (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 710-715.
- Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK (2008). Plasticity of hippocampal stem/progenitor cells to enhance neurogenesis in response to kainate-induced injury is lost by middle age. *Aging Cell* **7**: 207-224.
- Hattiangady B, Rao MS, Shetty GA, Shetty AK (2005). Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp Neurol* **195**: 353-371.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**: 1009-1031.
- Hebb D.O. (1949) *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. New York: John Wiley & Sons.
- Henneberger C, Rusakov DA (2010). Synaptic plasticity and Ca²⁺ signalling in astrocytes. *Neuron Glia Biol*: 1-6.
- Hernandez PJ, Abel T (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 293-311.
- Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232.
- Horn PJ, Peterson CL (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* **297**: 1824-1827.

Huang FL, Huang KP, Boucheron C (2007). Long-term enrichment enhances the cognitive behavior of the aging neurogranin null mice without affecting their hippocampal LTP. *Learn Mem* **14**: 512-519.

Hultsch DF, Hammer M, Small BJ (1993). Age differences in cognitive performance in later life: relationships to self-reported health and activity life style. *J Gerontol* **48**: 1-11.

-I-

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* **164**: 45-52.

Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**: 973-982.

Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, *et al.* (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**: 869-883.

Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci* **10**: 3247-3254.

-J-

Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, *et al.* (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* **29**: 7966-7977.

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.

Jin K, Sun Y, Xie L, Bateur S, Mao XO, Smelick C, *et al.* (2003). Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* **2**: 175-183.

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, *et al.* (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* **4**: 289-296.

Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* **3**: 323-329.

-K-

Kalkhoven E, Teunissen H, Houweling A, Verrijzer CP, Zantema A (2002). The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain. *Mol Cell Biol* **22**: 1961-1970.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009). NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001271.

Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, *et al.* (2006). NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* **26**: 2936-2946.

- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA (1995). Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9618-9622.
- Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**: 1030-1038.
- Kandel ER, Klein M, Castellucci VF, Schacher S, Goelet P (1986). Some principles emerging from the study of short- and long-term memory. *Neurosci Res* **3**: 498-520.
- Kandel ER. (1991). Nerve cells and behavior. In: principles of Neural Science. Kandel E.R., Schwartz J.H., and Jessell T.M., eds. *Elsevier, New York*. 18-32.
- Kang H, Welcher AA, Shelton D, Schuman EM (1997). Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* **19**: 653-664.
- Kangaspeka S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, *et al.* (2008). Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**: 112-115.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* **10**: 355-362.
- Kempermann G (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci* **31**: 163-169.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002). Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* **52**: 135-143.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**: 493-495.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* **18**: 3206-3212.
- Kesner RP, Hopkins RO (2006). Mnemonic functions of the hippocampus: a comparison between animals and humans. *Biol Psychol* **73**: 3-18.
- Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev* **35**: 295-303.
- Keyvani K, Sachser N, Witte OW, Paulus W (2004). Gene expression profiling in the intact and injured brain following environmental enrichment. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**: 598-609.
- Kida S, Josselyn SA, Pena de OS, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, *et al.* (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* **5**: 348-355.
- Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, *et al.* (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **35**: 870-880.
- Kim R, Moki R, Kida S (2011). Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Mol Brain* **4**: 9.
- Kim SH, Kang HJ, Na H, Lee MO (2010). Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein. *Breast Cancer Res* **12**: R22.
- Klempin F, Kempermann G (2007). Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **257**: 271-280.

Klose RJ, Zhang Y (2007). Regulation of histone methylation by demethyliminination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 307-318.

Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (2002). Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J Neurosci Res* **70**: 340-346.

Koponen E, Lakso M, Castren E (2004). Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* **130**: 81-94.

Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T (1996). The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris* **90**: 157-164.

Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* **42**: 961-972.

Koshibu K, Graff J, Beullens M, Heitz FD, Berchtold D, Russig H, *et al.* (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* **29**: 13079-13089.

Krugers HJ, Zhou M, Joels M, Kindt M (2011). Regulation of excitatory synapses and fearful memories by stress hormones. *Front Behav Neurosci* **5**: 62.

Kudo K, Wati H, Qiao C, Arita J, Kanba S (2005). Age-related disturbance of memory and CREB phosphorylation in CA1 area of hippocampus of rats. *Brain Res* **1054**: 30-37.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**: 2027-2033.

Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, Warashina M, Taira K, Gage FH (2005). The NRSE smRNA specifies the fate of adult hippocampal neural stem cells. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 87-88.

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, *et al.* (2011). Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus* **21**: 127-132.

-L-

Landfield PW, Lynch G (1977). Impaired monosynaptic potentiation in in vitro hippocampal slices from aged, memory-deficient rats. *J Gerontol* **32**: 523-533.

Landfield PW, McGaugh JL, Lynch G (1978). Impaired synaptic potentiation processes in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. *Brain Res* **150**: 85-101.

Landfield PW, Waymire JC, Lynch G (1978). Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science* **202**: 1098-1102.

Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE (1994). Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol* **4**: 259-275.

Laroche S (2010). [Cellular and molecular mechanisms of memory]. *Biol Aujourd'hui* **204**: 93-102.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* **73**: 193-207.

- Leal-Galicia P, Castaneda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiol Learn Mem* **90**: 511-518.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**: 839-843.
- Lee KK, Workman JL (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 284-295.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* **294**: 1945-1948.
- Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, *et al.* (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* **163**: 78-90.
- Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* **86**: 41-65.
- Lemaire V, Aurousseau C, Le MM, Abrous DN (1999). Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* **11**: 4006-4014.
- Lemaire V, Koehl M, Le MM, Abrous DN (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11032-11037.
- 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.
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, *et al.* (2006). Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* **281**: 15763-15773.
- Levenson JM, Sweatt JD (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* **6**: 108-118.
- Li B, Carey M, Workman JL (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-719.
- Li E (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**: 662-673.
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926.
- Li Q, Verma IM (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**: 725-734.
- Li S, Tian X, Hartley DM, Feig LA (2006). The environment versus genetics in controlling the contribution of MAP kinases to synaptic plasticity. *Curr Biol* **16**: 2303-2313.
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* **107**: 603-613.
- Lilienbaum A, Israel A (2003). From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* **23**: 2680-2698.
- Limback-Stokin K, Kozus E, Nagaoka-Yasuda R, Mayford M (2004). Nuclear calcium/calmodulin regulates memory consolidation. *J Neurosci* **24**: 10858-10867.

- Lindner MD (1997). Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* **68**: 203-220.
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* **9**: 2581-2587.
- Liu IY, Lyons WE, Mamounas LA, Thompson RF (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* **24**: 7958-7963.
- Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, *et al.* (2008). The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* **451**: 846-850.
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, *et al.* (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-926.
- Lopez-Atalaya JP, Ciccarelli A, Viosca J, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Canals S, *et al.* (2011). CBP is required for environmental enrichment-induced neurogenesis and cognitive enhancement. *EMBO J* **30**: 4287-4298.
- Loury R, Sassone-Corsi P (2003). Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods* **31**: 40-48.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008). BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* **89**: 312-323.
- Lubin FD (2011). Epigenetic gene regulation in the adult mammalian brain: multiple roles in memory formation. *Neurobiol Learn Mem* **96**: 68-78.
- Lubin FD, Ren Y, Xu X, Anderson AE (2007). Nuclear factor-kappa B regulates seizure threshold and gene transcription following convulsant stimulation. *J Neurochem* **103**: 1381-1395.
- Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* **28**: 10576-10586.
- Lubin FD, Sweatt JD (2007). The IkappaB kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* **55**: 942-957.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM (2006). Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Res Rev* **5**: 255-280.

-M-

- Ma YL, Wang HL, Wu HC, Wei CL, Lee EH (1998). Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience* **82**: 957-967.
- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, *et al.* (2000). Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4398-4403.
- Maharana C, Sharma KP, Sharma SK (2010). Depolarization induces acetylation of histone H2B in the hippocampus. *Neuroscience* **167**: 354-360.
- Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5-21.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**: 1870-1874.
- Malinow R, Malenka RC (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **25**: 103-126.

- Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, *et al.* (2004). Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci* **22**: 121-130.
- Marini AM, Rabin SJ, Lipsky RH, Mocchetti I (1998). Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem* **273**: 29394-29399.
- Marmigere F, Rage F, Tapia-Arancibia L (2001). Regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts by neuronal activation in rat hypothalamic neurons. *J Neurosci Res* **66**: 377-389.
- Marr D (1970). A theory for cerebral neocortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **176**: 161-234.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **23**: 649-711.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, *et al.* (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* **302**: 890-893.
- Martorana A, Esposito Z, Koch G (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neurosci Ther* **16**: 235-245.
- Massicotte G, Baudry M (2004). Brain plasticity and remodeling of AMPA receptor properties by calcium-dependent enzymes. *Genet Eng (N Y)* **26**: 239-254.
- Mattson MP, Meffert MK (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* **13**: 852-860.
- 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.
- Mayr B, Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 599-609.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**: 295-318.
- McDonald HY, Wojtowicz JM (2005). Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* **385**: 70-75.
- McEwen BS (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**: 105-122.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* **66**: 1121-1188.
- McGaugh JL (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* **287**: 248-251.
- McNair K, Broad J, Riedel G, Davies CH, Cobb SR (2007). Global changes in the hippocampal proteome following exposure to an enriched environment. *Neuroscience* **145**: 413-422.
- McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, *et al.* (2011). HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci* **31**: 764-774.
- Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A (1996). Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res Mol Brain Res* **38**: 179-190.
- Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* **11**: 925-933.
- Meffert MK, Baltimore D (2005). Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* **28**: 37-43.

- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* **6**: 1072-1078.
- Merz K, Herold S, Lie DC (2011). CREB in adult neurogenesis--master and partner in the development of adult-born neurons? *Eur J Neurosci* **33**: 1078-1086.
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le PC, Jurkowska RZ, Carmouche RP, *et al.* (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**: 45-50.
- Mifsud KR, Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Saunderson EA, Reul JM (2011). Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun* **25**: 1305-1315.
- Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD (2008). DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 599-603.
- Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, *et al.* (2010). Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* **13**: 664-666.
- Miller CA, Sweatt JD (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* **53**: 857-869.
- Miller DB, O'Callaghan JP (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev* **4**: 123-140.
- Ming GL, Song H (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**: 223-250.
- Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, *et al.* (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* **24**: 401-414.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T (2000). Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci* **20**: 1568-1574.
- Mizuno K, Giese KP (2005). Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist? *J Pharmacol Sci* **98**: 191-197.
- Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* **20**: 7116-7121.
- Moffat SD (2009). Aging and spatial navigation: what do we know and where do we go? *Neuropsychol Rev* **19**: 478-489.
- Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR (1993). Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res* **57**: 183-191.
- Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2002). Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci* **16**: 1107-1116.
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* **16**: 423-431.
- Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le MM, *et al.* (2006). Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiol Aging* **27**: 645-654.
- Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, *et al.* (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10827-10832.
- Montgomery JW (2000). Verbal working memory and sentence comprehension in children with specific language impairment. *J Speech Lang Hear Res* **43**: 293-308.

Mora F, Segovia G, Del AA (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev* **55** : 78-88.

Morano MI, Vazquez DM, Akil H (1994). The role of the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the aged Fisher rat. *Mol Cell Neurosci* **5**: 400-412.

Moreau PH, Cosquer B, Jeltsch H, Cassel JC, Mathis C (2008). Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mu p75-saporin in mice. *Hippocampus* **18**: 610-622.

Morgado-Bernal I (2011). Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* **176**: 12-19.

Morgan TE, Rozovsky I, Goldsmith SK, Stone DJ, Yoshida T, Finch CE (1997). Increased transcription of the astrocyte gene GFAP during middle-age is attenuated by food restriction: implications for the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **23**: 524-528.

Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**: 47-60.

Moser MB, Moser EI (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* **18**: 7535-7542.

Mouravlev A, Dunning J, Young D, During MJ (2006). Somatic gene transfer of cAMP response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4705-4710.

Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S (2002). LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med* **2**: 605-611.

Müller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle beitrage zur lehre vom gedächtnis. *Z Psychol* **1**: 1-288.

Muller RU, Kubie JL, Ranck JB, Jr. (1987). Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *J Neurosci* **7**: 1935-1950.

-N-

Nadel L, Moscovitch M (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 217-227.

Naka F, Narita N, Okado N, Narita M (2005). Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain Dev* **27**: 275-278.

Newman EA (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* **26**: 536-542.

Nichols NR, Agolley D, Zieba M, Bye N (2005). Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* **48**: 287-301.

Nichols NR, Zieba M, Bye N (2001). Do glucocorticoids contribute to brain aging? *Brain Res Brain Res Rev* **37**: 273-286.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* **39**: 569-578.

Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**: 697-709.

Nithianantharajah J, Hannan AJ (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* **89**: 369-382.

Nunn JA, Polkey CE, Morris RG (1998). Selective spatial memory impairment after right unilateral temporal lobectomy. *Neuropsychologia* **36**: 837-848.

-O-

Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, *et al.* (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* **96**: 121-129.

O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS (1991). Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem* **57**: 860-869.

O'Callaghan JP, Miller DB (1991). The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiol Aging* **12**: 171-174.

O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM (2009). Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* **19**: 1019-1029.

Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, *et al.* (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, *et al.* (1999). Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet* **8**: 387-396.

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* **34**: 171-175.

O'Keefe J, Nadel L (1978) The hippocampus as a cognitive map. Oxford: *Oxford University Press*.

Oler JA, Markus EJ (1998). Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. *Hippocampus* **8**: 402-415.

Oliveira AM, Abel T, Brindle PK, Wood MA (2006). Differential role for CBP and p300 CREB-binding domain in motor skill learning. *Behav Neurosci* **120**: 724-729.

Oliveira AM, Estevez MA, Hawk JD, Grimes S, Brindle PK, Abel T (2011). Subregion-specific p300 conditional knock-out mice exhibit long-term memory impairments. *Learn Mem* **18**: 161-169.

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.

Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR (1994). Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* **23**: 349-353.

Olton DS, Raffaele KC (1990). Long-term effects of cholinergic agonists on memory. *NIDA Res Monogr* **97**: 37-47.

Olton DS, Walker JA, Gage FH (1978). Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Res* **139**: 295-308.

O'Mahony A, Raber J, Montano M, Foehr E, Han V, Lu SM, *et al.* (2006). NF-kappaB/Rel regulates inhibitory and excitatory neuronal function and synaptic plasticity. *Mol Cell Biol* **26**: 7283-7298.

Ou LC, Gean PW (2007). Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol* **72**: 350-358.

Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL (2006). Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus* **16**: 208-215.

-P-

Pang PT, 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.

Panteleeva I, Boutillier S, See V, Spiller DG, Rouaux C, Almouzni G, *et al.* (2007). HP1alpha guides neuronal fate by timing E2F-targeted genes silencing during terminal differentiation. *EMBO J* **26**: 3616-3628.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* **16**: 1137-1145.

Pavlidis C, Watanabe Y, McEwen BS (1993). Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* **3**: 183-192.

Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, *et al.* (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**: 753-756.

Pena Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM (2009). Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* **34**: 1390-1404.

Penner MR, Roth TL, Chawla MK, Hoang LT, Roth ED, Lubin FD, *et al.* (2011). Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiol Aging* **32**: 2198-2210.

Peters AH, Schubeler D (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 230-238.

Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* **94**: 279-286.

Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, *et al.* (2002). Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* **34**: 447-462.

Plassman BL, Williams JW, Jr., Burke JR, Holsinger T, Benjamin S (2010). Systematic review: factors associated with risk for and possible prevention of cognitive decline in later life. *Ann Intern Med* **153**: 182-193.

Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, *et al.* (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* **52**: 437-444.

Poo MM (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* **2**: 24-32.

Porte Y, Buhot MC, Mons N (2008). Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiol Aging* **29**: 1533-1546.

Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, *et al.* (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* **19**: 4972-4983.

-R-

Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, *et al.* (2000) (b). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12880-12884.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000) (a). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* **3**: 238-244.

Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* **21**: 464-476.

Rapp PR, Rosenberg RA, Gallagher M (1987). An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behav Neurosci* **101**: 3-12.

Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ (2004). Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn Mem* **11**: 727-731.

Reul JM, Chandramohan Y (2007). Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation. *Psychoneuroendocrinology* **32 Suppl 1**: S21-S25.

Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mecinas MG (2009). Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* **4**: 434-439.

Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Marco S, Perez-Otano I, Garcia-Osta A (2010). Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*.

Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Perez-Mediavilla A, Frechilla D, Del RJ, Garcia-Osta A (2009). Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1721-1732.

Ridley RM, Pugh P, Maclean CJ, Baker HF (1999). Severe learning impairment caused by combined immunotoxic lesion of the cholinergic projections to the cortex and hippocampus in monkeys. *Brain Res* **836**: 120-138.

Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**: 9-25.

Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* **19**: 4337-4348.

Robertson KD, Wolffe AP. (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* **1**(1):11-9. Review.

Roosendaal B, Brunson KL, Holloway BL, McGaugh JL, Baram TZ (2002) (b). Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13908-13913.

Roosendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL (2002) (a). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* **15**: 553-560.

Rosenblum K, Futter M, Voss K, Erent M, Skehel PA, French P, *et al.* (2002). The role of extracellular regulated kinases I/II in late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* **22**: 5432-5441.

Rosenzweig ES, Barnes CA (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* **69**: 143-179.

Rosenzweig MR (1996). Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol* **47**: 1-32.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* **78**: 57-65.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978). Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* **153**: 563-576.

Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, *et al.* (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* **24**: 1850-1856.

Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.

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.

Rowe WB, Blalock EM, Chen KC, Kadish I, Wang D, Barrett JE, *et al.* (2007). Hippocampal expression analyses reveal selective association of immediate-early, neuroenergetic, and myelinogenic pathways with cognitive impairment in aged rats. *J Neurosci* **27**: 3098-3110.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P (2001). Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol Behav* **74** : 313-320.

Rudy JW, Biedenkapp JC, O'Reilly RC (2005). Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learn Mem* **12**: 445-446.

-S-

Saarelainen T, Vaittinen S, Castren E (2001). trkB-receptor activation contributes to the kainate-induced increase in BDNF mRNA synthesis. *Cell Mol Neurobiol* **21**: 429-435.

Saha RN, Pahan K (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* **13**: 539-550.

Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K (2011). CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* **116**: 1-9.

Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2011). Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8479-8484.

Sarter M, Bruno JP (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev* **23**: 28-46.

Sastry BV, Janson VE, Jaiswal N, Tayeb OS (1983). Changes in enzymes of the cholinergic system and acetylcholine release in the cerebra of aging male Fischer rats. *Pharmacology* **26**: 61-72.

- Sato M, Suzuki K, Nakanishi S (2001). NMDA receptor stimulation and brain-derived neurotrophic factor upregulate homer 1a mRNA via the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* **21**: 3797-3805.
- Schaaf MJ, Workel JO, Lesscher HM, Vreugdenhil E, Oitzl MS, De Kloet ER (2001). Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res* **915**: 227-233.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* **6**: 97-110.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* **192**: 348-356.
- Schinder AF, Berninger B, Poo M (2000). Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* **25**: 151-163.
- Schlessinger AR, Cowan WM, Gottlieb DI (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* **159**: 149-175.
- Schliebs R, Arendt T (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* **221**: 555-563.
- Schratt GM, Nigh EA, Chen WG, Hu L, Greenberg ME (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci* **24**: 7366-7377.
- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Wurbel H (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* **73**: 209-224.
- Segovia G, Del AA, Garrido P, de BM, Mora F (2008). Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochem Int* **52**: 1198-1203.
- Segovia G, Yague AG, Garcia-Verdugo JM, Mora F (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull* **70**: 8-14.
- Selvi BR, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL (2010). Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1799**: 840-853.
- 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.
- Sharma SK (2010). Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. *Neurosci Biobehav Rev* **34**: 1234-1240.
- Sheng JG, Mrak RE, Rovnaghi CR, Kozlowska E, Van Eldik LJ, Griffin WS (1996). Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **17**: 359-363.
- Shilatifard A (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**: 243-269.
- Shimamura AP (1995). Memory and the prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci* **769**: 151-159.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, et al. (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* **2**: e895.

- Sierra-Mercado D, Dieguez D, Jr., Barea-Rodriguez EJ (2008). Brief novelty exposure facilitates dentate gyrus LTP in aged rats. *Hippocampus* **18**: 835-843.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* **21**: 127-148.
- Simpson J, Kelly JP (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* **222**: 246-264.
- Small SA, Chawla MK, Buonocore M, Rapp PR, Barnes CA (2004). Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7181-7186.
- Soffie M, Hahn K, Terao E, Eclancher F (1999). Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* **101**: 37-49.
- Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K (2006). Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav* **83**: 186-193.
- Squire LR, Alvarez P (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 169-177.
- Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993). The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* **44**: 453-495.
- Squire LR, Zola-Morgan S (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**: 1380-1386.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9447-9452.
- Steward O, Worley PF (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* **30**: 227-240.
- Stone SS, Teixeira CM, Devito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, *et al.* (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J Neurosci* **31**: 13469-13484.
- Storey E, Slavin MJ, Kinsella GJ (2002). Patterns of cognitive impairment in Alzheimer's disease: assessment and differential diagnosis. *Front Biosci* **7**: e155-e184.
- Strahl BD, Allis CD (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Su X, Kameoka S, Lentz S, Majumder S (2004). Activation of REST/NRSF target genes in neural stem cells is sufficient to cause neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* **24**: 8018-8025.
- Sugaya K, Chouinard M, Greene R, Robbins M, Personett D, Kent C, *et al.* (1996). Molecular indices of neuronal and glial plasticity in the hippocampal formation in a rodent model of age-induced spatial learning impairment. *J Neurosci* **16**: 3427-3443.
- Suh H, Deng W, Gage FH (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 253-275.
- Sun YM, Greenway DJ, Johnson R, Street M, Belyaev ND, Deuchars J, *et al.* (2005). Distinct profiles of REST interactions with its target genes at different stages of neuronal development. *Mol Biol Cell* **16**: 5630-5638.
- Sutton MA, Schuman EM (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* **127**: 49-58.
- Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, *et al.* (2011). Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J Neurosci* **31**: 8786-8802.
- Sweatt JD (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* **76**: 1-10.

Sweatt JD, Atkins CM, Johnson J, English JD, Roberson ED, Chen SJ, *et al.* (1998). Protected-site phosphorylation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem* **71**: 1075-1085.

-T-

Tabuchi A (2008). Synaptic plasticity-regulated gene expression: a key event in the long-lasting changes of neuronal function. *Biol Pharm Bull* **31**: 327-335.

Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M (2002) (a). Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* **277**: 35920-35931.

Tabuchi A, Yamada T, Sasagawa S, Naruse Y, Mori N, Tsuda M (2002) (b). REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 415-420.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* **41**: 779-790.

Tanner KG, Trievel RC, Kuo MH, Howard RM, Berger SL, Allis CD, *et al.* (1999). Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* **274**: 18157-18160.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* **59**: 201-220.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, *et al.* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**: 5455-5463.

Thibault O, Landfield PW (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* **272**: 1017-1020.

Thiriet N, Amar L, Toussay X, Lardeux V, Ladenheim B, Becker KG, *et al.* (2008). Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. *Brain Res* **1222**: 31-41.

Thompson PR, Wang D, Wang L, Fulco M, Pediconi N, Zhang D, *et al.* (2004). Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 308-315.

Tian F, Hu XZ, Wu X, Jiang H, Pan H, Marini AM, *et al.* (2009). Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J Neurochem* **109**: 1375-1388.

Tian F, Marini AM, Lipsky RH (2010). NMDA receptor activation induces differential epigenetic modification of Bdnf promoters in hippocampal neurons. *Amino Acids* **38**: 1067-1074.

Toescu EC, Verkhatsky A, Landfield PW (2004). Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* **27**: 614-620.

Tongiorgi E, Baj G (2008). Functions and mechanisms of BDNF mRNA trafficking. *Novartis Found Symp* **289**: 136-147.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* **93**: 83-90.

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.

Tramontina F, Conte S, Goncalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, *et al.* (2002). Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* **22**: 373-378.

Triebel RC, Rojas JR, Sterner DE, Venkataramani RN, Wang L, Zhou J, *et al.* (1999). Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8931-8936.

Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5919-5924.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 355-367.

-V-

Valenzuela MJ (2008). Brain reserve and the prevention of dementia. *Curr Opin Psychiatry* **21**: 296-302.

Valor LM, Pulopulos MM, Jimenez-Minchan M, Olivares R, Lutz B, 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.

van PH, Kempermann G, Gage FH (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* **2**: 266-270.

van PH, Kempermann G, Gage FH (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* **1**: 191-198.

van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**: 272-282.

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.

Vergheze J, Lipton RB, Katz MJ, Hall CB, Derby CA, Kuslansky G, *et al.* (2003). Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. *N Engl J Med* **348**: 2508-2516.

Vermeulen L, De WG, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G (2002). Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* **64**: 963-970.

Verret L, Trouche S, Zerwas M, Rampon C (2007). Hippocampal neurogenesis during normal and pathological aging. *Psychoneuroendocrinology* **32 Suppl 1**: S26-S30.

Vo N, Goodman RH (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* **276**: 13505-13508.

Volterra A, Meldolesi J (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* **6**: 626-640.

-W-

- Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, Xu R, During MJ, Dragunow M (1999). CREB phosphorylation promotes nerve cell survival. *J Neurochem* **73**: 1836-1842.
- Watson JD, Crick FH (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **18**: 123-131.
- Watt F, Molloy PL (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**: 1136-1143.
- Wilkniss SM, Jones MG, Korol DL, Gold PE, Manning CA (1997). Age-related differences in an ecologically based study of route learning. *Psychol Aging* **12**: 372-375.
- Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, *et al.* (2001). Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav* **73**: 649-658.
- Wilson RS, Mendes De Leon CF, Barnes LL, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, *et al.* (2002). Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA* **287**: 742-748.
- Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**: 481-486.
- Woo NH, Duffy SN, Abel T, Nguyen PV (2003). Temporal spacing of synaptic stimulation critically modulates the dependence of LTP on cyclic AMP-dependent protein kinase. *Hippocampus* **13**: 293-300.
- Wood MA, Attner MA, Oliveira AM, Brindle PK, 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 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.
- Wright RL, Conrad CD (2008). Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behav Brain Res* **187**: 41-47.

-X-

- Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, *et al.* (2000). The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci* **20**: 6888-6897.
- Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Wu H, *et al.* (2010). Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**: 933-940.
- Xu K, Dai XL, Huang HC, Jiang ZF (2011). Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* **2011**: 143269.
- Xu W, Edmondson DG, Roth SY (1998). Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* **18**: 5659-5669.

-Y-

Yamada K, Nabeshima T (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* **91**: 267-270.

Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.

Yin Y, Edelman GM, Vanderklisch PW (2002). The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2368-2373.

Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, *et al.* (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* **22**: 1532-1540.

-Z-

Zaho C, Deng W, Gage FH. (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**(4):645-60.

Zajac MS, Pang TY, Wong N, Weinrich B, Leang LS, Craig JM, *et al.* (2010). Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus* **20**: 621-636.

Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, *et al.* (2003). Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* **39**: 975-990.

Zeier Z, Madorsky I, Xu Y, Ogle WO, Notterpek L, Foster TC (2011). Gene expression in the hippocampus: regionally specific effects of aging and caloric restriction. *Mech Ageing Dev* **132**: 8-19.

Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, *et al.* (2011). Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *J Neurosci* **31**: 17800-17810.

Zhong L, Yan CH, Lu CQ, Xu J, Huang H, Shen XM (2009). Calmodulin activation is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Neurol Res* **31**: 707-713.

Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, *et al.* (2006). Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. *PLoS One* **1**: e16.

Zippo A, Serafini R, Rocchigiani M, Pennacchini S, Krepelova A, Oliviero S (2009). Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* **138**: 1122-1136.

Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, *et al.* (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* **35**: 76-8

Acétylation des histones au cours des processus de mémorisation : Influence du vieillissement et de l'environnement enrichi.

La formation de souvenirs nécessite la mise en place de programmes génétiques dans l'hippocampe. L'activation de la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité comme le *bdnf* s'effectue, au moins en partie, *via* l'acétylation des histones, mécanisme qui permet des changements de la structure de la chromatine. Nos résultats soulignent l'existence d'une régulation spécifique et différentielle de l'acétylation des histones dans l'hippocampe de rongeurs adultes en fonction du type d'information à traiter. Les acétylations des histones H2B et H4 sont spécifiques de l'apprentissage d'une tâche (MWM, CFC) alors que celle de l'histone H3 semble plus sensible au contexte environnemental. Il est par ailleurs décrit que le vieillissement ainsi que l'environnement enrichi (EE) sont des facteurs susceptibles d'induire des changements d'acétylation des histones, aboutissant respectivement à la répression et à l'activation de gènes de « mémoire ». Nos études mettent en évidence qu'un EE de 6 mois, même appliqué à des rats âgés de 18 mois qui présentent déjà des déficits mnésiques, est capable d'induire des modifications durables de la structure de la chromatine par l'intermédiaire de H3. En favorisant l'expression de gènes comme le *bdnf*, ces changements participent au maintien des capacités mnésiques, normalement perdues chez le Rat âgé de 24 mois. Dans l'ensemble, nos résultats soulignent l'importance des mécanismes liés aux acétylations des histones dans les processus mnésiques et indiquent que ces régulations restent modulables au cours de la vie, permettant d'envisager d'éventuelles options thérapeutiques dans des conditions de vieillissement pathologique.

Mots clés : mémoire, hippocampe, acétylation des histones, vieillissement, environnement enrichi.

Histone acetylation and memory processes: Impact of ageing and environmental enrichment.

Hippocampal-dependent memory formation is associated with the establishment of specific genetic programs in the rat hippocampus. This transcriptional activation of genes involved in synaptic plasticity and memory processes, like *bdnf*, can in part be attributable to histone acetylation-related mechanisms, allowing dynamic chromatin structure changes. Our results indicate a specific and differential regulation of histone acetylation in young rodents hippocampus depending on the nature of the stimuli. In fact, H2B and H4 acetylations are specific to rats having learnt a task (MWM, CFC), whereas H3 acetylation seems to be more sensitive to the environmental context. Besides, it is known that ageing and environmental enrichment (EE) are factors able to modulate histone acetylation, leading respectively to repression and activation of memory-related genetic programs. Here, we showed that an EE of 6 months, even applied to 18 month-old rats, which already present memory deficits, is able to induce persistent chromatin structure modifications through H3. By favoring the expression of genes as *bdnf*, these changes could participate in the preservation of memory abilities, which are normally lost in 24 month-old rats. The precise identification of regulating elements located on the *bdnf* promoter brings new data about the potential factors involved in the transcriptional response following EE, e.g. CREB and NFκB. Altogether, our results confirm the role of histone acetylation in memory processes and underline that these regulations remain flexible during life, thus highlighting possible therapeutic strategies in pathological ageing conditions.

Key words: memory, hippocampus, histone acetylation, ageing, environmental enrichment.