



#### **N° d'ordre : 4712**

## THÈSE

### PRÉSENTEE À

## L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

## **Malorie DAGNAS**

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

## DOCTEUR

SPECIALITE NEUROSCIENCES

## ROLE DE L'ACETYLATION DES HISTONES DANS DIFFERENTES FORMES DE MEMOIRE IMPLIQUANT L'HIPPOCAMPE ET LE STRIATUM CHEZ LA SOURIS : EFFET DU VIEILLISSEMENT

Thèse soutenue le 14 décembre 2012

*Après avis de :* Mme Hélène MARIE (CR, CNRS UMR 7275, Univ. Nice) Mr Bruno POUCET (DR, UMR 7291, Univ. Aix Marseille)

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Hélène MARIE (CR, CNRS UMR 7275, Univ. Nice)	Rapporteur
Mr Bruno POUCET (DR, CNRS UMR 7291, Univ. Aix Marseille)	
Mme Joëlle ROCHE (Pr., CNRS FRE 3511, Univ. Poitiers)	Examinateur
Mme Nicole MONS (CR. CNRS UMR 5287, Univ. Bordeaux)	Directeur de thèse
Mme Catherine LE MOINE (DR, CNRS UMR 5287, Univ. Bordeaux)	Président du jury

## **Avant-propos**

Ce travail de thèse a été effectué, dans un premier temps, au Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives (CNRS UMR5228), dirigé par Georges Di Scala, devenu ensuite l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (CNRS UMR5287), dirigé par Jean-René Cazalets, à l'Université de Bordeaux I, sous la direction du Dr Nicole MONS. Il a fait l'objet d'une publication sous presse et d'une publication soumise, ainsi que d'une communication orale et de trois communications affichées.

#### Publications avec comité de lecture

**Dagnas M**., Mons N. Region- and age-specific changes in histone acetylation by spatial and cued learning in the water maze. (*Soumis à Hippocampus*).

**Dagnas M**., Guillou J.L., Mons N. HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. (*Journal of Neuroscience, sous presse*).

**Dagnas M**., Porte Y., Micheau J., Beracochéa D., Mons N. Post-training intra-CA1 infusion of Trichostatin A disrupts spatial memory in aged mice. (*En préparation*).

#### **Communication orale**

**M. Dagnas**. Acétylation des histones et mémoire spatiale en piscine de Morris, *colloque du GDR NeuroMem, Cargèse, 20-23 mars 2012* 

#### **Communications affichées**

**M. Dagnas**, Y. Porte, G. Dominguez, M. Vandesquille, D. Béracochéa, J. Micheau and N. Mons. Effects of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on spatial memory in mice, *colloque du GDR NeuroMem, Oléron, 17-19 mai 2010* 

**M. Dagnas**, Y. Porte, D. Béracochéa, J. Micheau and N. Mons. Age-dependent spatial memory impairment is associated with altered histone H3 and H4 acetylation in mice,  $10^e$  colloque de la Société des Neurosciences Françaises, Marseille, 24-27 mai 2011

**M. Dagnas**, Y. Porte, D. Béracochéa, J. Micheau and N. Mons. Age-dependent spatial memory impairment is associated with altered histone H3 and H4 acetylation in mice, *Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Arcachon, 28 mars 2012.* 

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr. Georges Di Scala, directeur de l'ex Centre de Neurosciences Intégratives et cognitives pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès ma première année de Master et pour avoir toujours su exprimer un mot d'encouragement, au détour d'un couloir.

Je remercie le Dr Hélène Marie ainsi que le Pr Bruno Poucet pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit, ainsi que le Pr Joëlle Roche pour avoir examiné ce travail le jour de la soutenance. Je remercie également le Dr Catherine Le Moine de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je suis très reconnaissante de l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit ainsi que de leurs remarques pertinentes et constructives.

Je tiens bien entendu à remercier ma directrice de thèse, le Docteur Nicole Mons, pour m'avoir tout d'abord encadrée lors de mon stage de Master 2, puis pour m'avoir accompagnée sur le plan professionnel et humain tout au long de ces 3 années de thèse. Un grand Merci pour m'avoir guidée, écoutée, soutenue tout au long de cette thèse. Je garderai un très bon souvenir de ces années passées ensemble, ainsi que de tous les moments passés en votre compagnie, à la paillasse ou encore à la pause café du matin.

J'en profite également pour remercier le Pr Jacques Micheau et le Dr Aline Marighetto, qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche. Il est certain que sans Aline, je n'aurais jamais réalisé cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble de l'équipe « Interactions entre émotions et systèmes de mémoire ». Je remercie tout d'abord son directeur, Daniel Béracochéa. Merci aussi aux autres membres de l'équipe : à Jacques Micheau pour ses conseils avisés, à Jean-Louis Guillou pour son aide très précieuse lors de mes dernières manips, à Marc Corio, Vincent David, Rose-Marie Vouimba et Mathieu Wolff pour toutes ces interactions, scientifiques ou non. Merci aux étudiants de l'équipe : Marianne, Gaëlle, Pierre et Thomas (merci à toi aussi pour ton aide au pied levé), ainsi qu'à Nadia Henkous, Laurence Decorte et Ali Krazem pour l'aide et le soutien que vous m'avez apporté.

Voici venue l'heure de remercier un certain nombre de mes camarades étudiants (ou pas) avec qui j'ai partagé les fous rires et les déboires de la vie de thésard et avec qui j'ai

passé d'agréables moments de détente. En premier lieu, merci aux plus anciens, qui ont partagé les premières années de ma thèse : merci à Delphine pour ces bons moments passés en ta compagnie, merci à Yves pour tes précieux conseils, et merci à Nadia pour ton soutien, ta bonne humeur et ces quelques TP dispensés ensemble. Merci particulièrement aux plus jeunes : Fabien, pour m'avoir supportée avec mes blagues débiles durant ces quelques mois de cohabitations (notamment les mois de rédaction...). Merci à « mes petits » : Fabien (Albert !!!) et ses sourcils ! Merci pour tes histoires « étonnantes » et surtout ta façon de les raconter et pour tes fameuses boites du midi, pense à moi pour ton premier one man show (et gare aux péruviens !!!). Chloé, ma parisienne préférée (désolée, t'as dû en baver...), merci pour tous les kinder time et pour les quelques discussions qu'on a pu avoir, tu as un don certain pour le remontage de moral ! Pour tous les deux, la cohabitation fut de courte durée, mais j'en garderai un excellent souvenir (vive Basquiat... et ce sacré physicien d'Oscar Wilde !). Merci à mes compères, Dupont et Dupond, pour tous ces fous rires en salle de manip, merci pour votre constante bonne humeur. Merci Pierre pour le petit coup de main le soir de l'impression de mon manuscrit (et pour les rillettes aussi), et merci Thomas pour ces matinées water maze/microdia (ou dénudage, au choix...). Désolée pour le ferry boaaaaat...et à très vite j'espère, pour une petite soirée patates dans le jus-macarons ! Merci également à Virginie (vive Périgueux !) et à Angélique (allez l'ASM !), qui viennent compléter la petite troupe du midi.

Je tiens également à remercier Dominique Panzeri, Nathalie Argenta et Jennifer Huard pour avoir pris soin de mes souris, ou de moi-même. Merci également à Marie-Laure Rousseau pour tout le côté administratif et à Angélique Faugère et Laurence Decorte pour leur aide précieuse en histologie.

Merci enfin à l'ensemble des chercheurs, étudiants ou techniciens que j'ai pu côtoyer tout au long de ces années.

Je voudrais également remercier certaines personnes « hors labo » qui m'ont toujours encouragé, de près ou de loin. Merci à Jean-Marc pour ces soirées en ta compagnie, toujours très sympathiques. Je tiens à te remercier pour ces quelques mots, juste avant le début de ma soutenance, qui m'ont beaucoup aidée. Je remercie également du fond du cœur mes 4 amies, Aurélie, Ana (ma camarade de galère, c'est fini !!!), Coline et Audrey (un grand merci à vous deux pour les relectures, parfois en très peu de temps). Ce fut un bonheur de partager avec vous mes premières années d'études. Merci d'avoir toujours su être là au bon moment. Mes derniers remerciements iront tout naturellement à ma famille. Je tiens à remercier mes beaux-parents, ainsi qu'Aurélien, Thibault, Aline, Pierre et Aurore pour leur bienveillance et leur soutien. Un énorme Merci à mes parents, à mes grands-parents, à ma super grande sœur Marion et à Nico pour m'avoir accompagnée, soutenue et encouragée tout au long de ces 8 années d'études. Enfin, à Laurent, Merci pour tout.

Et j'en oublie certainement... A vous tous, MERCI !!!

### Résumé

Les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la plasticité et la mémoire. Parmi ces modifications, l'acétylation des histones permet le maintien de la chromatine dans un état « permissif », accessible pour la transcription. Nos travaux visent à identifier le rôle joué par l'acétylation de deux histones, H3 et H4, dans la formation de différentes formes de mémoire mettant en jeu les systèmes hippocampique et striatal chez la souris. Nous avons également recherché si des perturbations d'acétylation des histones sont responsables des déficits mnésiques observés au cours du vieillissement. Nous avons utilisé deux types d'apprentissage en piscine de Morris permettant de dissocier la mémoire spatiale, impliquant principalement l'hippocampe et la mémoire procédurale/indicée, impliquant le striatum. Nos résultats mettent en lumière une régulation différentielle de l'acétylation des histones dans l'hippocampe et le striatum selon la nature de la tâche et l'âge des animaux. L'apprentissage spatial induit une augmentation de l'acétylation des histones sélectivement dans l'hippocampe (CA1 et gyrus denté) alors que la tâche indicée augmente l'acétylation des histores spécifiquement dans le striatum. Nous montrons également que des changements opposés de l'acétylation de H3 (augmentation) et de H4 (diminution) dans l'hippocampe pourraient contribuer aux déficits de mémoire spatiale observés chez les souris âgées. Lors d'un test de compétition en piscine de Morris, durant lequel les souris ont le choix entre les stratégies spatiale et indicée pour résoudre la tâche, l'injection intra-hippocampique de Trichostatine A (TSA), un inhibiteur des histones déacétylases, immédiatement après l'apprentissage, perturbe la fonction striatale et favorise l'utilisation préférentielle de la stratégie spatiale hippocampique. Cependant, cet effet de la TSA est absent chez les souris âgées dont la fonction hippocampique est altérée. Dans une dernière série d'expérience, l'analyse des effets d'une injection intra-hippocampique de TSA, après un apprentissage spatial, a permis de préciser les contributions respectives des histones H3/H4 et du facteur de transcription CREB dans les déficits mnésiques associés au vieillissement. Dans leur ensemble, nos travaux apportent des éléments importants concernant l'importance de l'acétylation des histones dans la modulation des interactions entre systèmes de mémoire hippocampique et striatal.

**Mots-clés :** Systèmes de mémoire, mémoire spatiale, mémoire procédurale, acétylation des histones, CREB, vieillissement, hippocampe, striatum, consolidation mnésique, piscine de Morris, souris.

### Abstract

Post-translational modifications of histone proteins play a crucial role in regulating plasticity and memory-related gene expression. Among these modifications, histone acetylation leads to a relaxed or "opened" chromatin state, permissive for transcription. Our work aims to identify the role played by histone H3 and H4 acetylation in the formation of different forms of memory involving hippocampal and striatal systems in mice. We also examined whether alterations of histone acetylation are responsible for age-associated memory deficits. We used two versions of the Morris water maze learning task to dissociate a spatial form of memory that relies on the hippocampus and a procedural/cued memory supported by the striatum. Our results highlight a differential regulation of histone acetylation within the hippocampus and striatum depending on the nature of the task and age of animals. Spatial and cued learning elicited histone acetylation selectively in the hippocampus (CA1 region and dentate gyrus) and the striatum, respectively. Age-related spatial memory deficits were associated with opposite changes in H3 acetylation (increase) and H4 (decrease) selectively in the hippocampus. During a water maze competition task in which mice can choose between spatial and cue-guided strategies, intra-hippocampal injection of Trichostatin A (TSA), an histone deacetylase inhibitor, immediately post-acquisition, impaired striatal function and promoted the use of a hippocampus-based spatial strategy. However, this effect of TSA was absent in old mice in which hippocampal function is impaired. In a final series of experiments, analysis of the effects of intra-hippocampal TSA injection immediately after a spatial training helped to clarify the respective contributions of histone H3/H4 and the transcription factor CREB in spatial memory deficits associated with aging. Taken together, our work provides important information regarding the importance of histone acetylation in modulating interactions between hippocampal and striatal memory systems.

**Key words:** Memory systems, spatial memory, procedural memory, histone acetylation, CREB, aging, hippocampus, striatum, memory consolidation, Morris water maze, mice.

## SOMMAIRE

Liste des	abréviations17	7
Liste des	figures19	)
INTROD	JCTION GENERALE 21	L
Partie I	: Les mémoires23	3
I.A. Les	systèmes de mémoire2	3
I.A.1.	Une classification des systèmes de mémoire : le modèle de Squire	4
I.A.2.	Théories relatives à la mémoire déclarative et modélisation chez l'animal	6
<i>a</i> )	La mémoire « episodic-like » chez l'animal20	6
b)	La théorie relationnelle	7
<i>c)</i>	L'hippocampe et la théorie des cartes spatiales	8
d)	Le dispositif de la piscine de Morris	9
I.A.3.	Les interactions entre systèmes de mémoire	1
<i>a</i> )	La double dissociation : émergence de la notion d'interactions entre système	S
mn	ésiques3	1
<i>b)</i>	La théorie du fonctionnement multiple et parallèle des systèmes (Multiple Paralle	?l
Me	mory Systems, MPMS)	3
<i>c)</i>	Relations anatomiques entre hippocampe et striatum	5
d)	Données expérimentales en faveur de l'existence d'interactions entre système	S
hip	pocampique et striatal	7
I.B. Méc	anismes neurobiologiques de la consolidation mnésique	0
I.B.1.	La consolidation systémique : hypothèse classique et théorie des traces multiples 42	2
<i>a</i> )	La théorie standard	2
<i>b)</i>	La théorie des traces multiples4	4
I.B.2.	La consolidation cellulaire	6
<i>a</i> )	Mécanismes physiologiques de l'encodage de la mémoire : le modèle de l	а
pot	entialisation à long terme (PLT)4	6
<i>b)</i>	Mécanismes cellulaires et moléculaires de la consolidation	8

II.A. L'é	pigénétique	53
II.A.1.	Définition de l'épigénétique	53
II.A.2.	Structure de la chromatine	54
II.A.3.	Les histones et leurs modifications : le « code histone »	56
I.B. Rôl	e de l'acétylation des histones dans la plasticité synaptique et les mé	moires
hippoca	mpo-dépendantes	59
II.B.1.	Acétylation des histones et plasticité synaptique	59
II.B.2.	Implication de l'acétylation des histones dans les processus de mémorisation	60
I.C. Rôl	e particulier des histones acétyltransférases et histones déacétylases	62
II.C.1.	Les histones acétyltransférases	63
a)	Régulation de l'activité de CBP	63
b)	CBP et mémoires hippocampo-dépendantes	64
c)	p300 et mémoires hippocampo-dépendantes	65
	Les histones déacétylases (HDACs) et leurs inhibiteurs (IHDACs)	65
II.C.2.	Classifications des UDACs et UDACs	65
II.C.2. <i>a)</i>	Classifications des HDACs et IHDACs	
II.C.2. <i>a)</i> <i>b)</i>	HDACs et mémoires hippocampo-dépendantes	68

<b>Objectifs généraux</b>	des travaux	de thèse	77	7
---------------------------	-------------	----------	----	---

MATERIELS ET METHODES			
A	. An	imaux et procédure comportementale	
	A.1. L	ignée et conditions d'élevage	
	A.2. L	a piscine de Morris	
	a)	Procédure générale	
	<i>b)</i>	Description des différents protocoles utilisés	
	<i>c)</i>	Analyses des paramètres comportementaux	

	88
B.1. Implantation de guide-canules dans l'hippocampe dorsal	
B.2. Injections intra-cérébrales de Trichostatine A	89
B.3. Contrôles histologiques	89
C. Immunomarquages	
C.1. Perfusion et fixation des cerveaux	
C.2. Marquages immunohistochimiques et immunofluorescence	
a) Procédure générale	
b) Immunohistochimie anti-histones H3 et H4 acétylées	
c) Immunohistochimie anti-CREB phosphorylé	
d) Immunofluorescence	
C.3. Quantification du marquage immunohistochimique et analyses statistiques	
CHAPITRE I : Acétylation des histones hippocampiques et st	riatales
en fonction de la nature de la tâche mnésique (Article 1)	95
en fonction de la nature de la tache innesique (Article 1)	
A Introduction	97
A. Introduction	•••••••••••
A. Introduction B. Méthodologie	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2)	98 
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions	etylases ion en 139 141 142 143
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spat	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spat cours du vieillissement (Article 3)	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spat cours du vieillissement (Article 3)	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spat cours du vieillissement (Article 3) A. Introduction B. Méthodologie	
A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigat piscine de Morris (Article 2) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacé hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spat cours du vieillissement (Article 3) A. Introduction B. Méthodologie C. Principaux résultats et conclusions	98 98 98 98 98 

DISCUSSION GENERALE	. 197

A. Le profil d'acétylation des histones est spécifique du type d'informations à
consolider
A.1. La cartographie de l'acétylation des histones suite à un apprentissage indicé ou spatial confirme la double dissociation de la fonction du striatum et de l'hippocampe
A 2 Le profil d'acétylation des histores dans l'hippocampe est spécifique de la nature des
informations à consolider
B. Les mécanismes d'acétylation des histones sont altérés au cours du vieillissement
normal
B.1. L'acétylation des histones est perturbée au cours du vieillissement
B.2. La balance HATs/HDACs serait altérée au cours du vieillissement
B.3. Données préliminaires en faveur d'une dérégulation des interactions entre HATs, HDACs
et CREB au cours du vieillissement
C. Les IHDACs comme perspective thérapeutique prometteuse ?
C.1. Les IHDACs améliorent les performances mnésiques des animaux sains
C.2. Les IHDACs sont inefficaces chez les animaux âgés
a) L'injection post-apprentissage de TSA ne rétablirait pas l'interaction CREB/CBP 214
b) L'injection post-apprentissage de TSA ne rétablirait pas la fonction hippocampique 215
C.3. Un effet délétère des IHDACs ?
a) L'administration de TSA potentialiserait la réponse au stress
<i>b) Certaines HDACs régulent positivement la formation de la mémoire</i>
D. Conclusion et perspectives

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

## Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclases ACSF : Liquide cérébro-spinal artificiel BDNF : Brain-derived neurotrophic factor Ca<sup>2+</sup>: Calcium CA1-CA3 : Champs amnoniques 1-3 CaMK : Calmoduline kinase CBP : CREB binding protein CRAM1 : Coactivator Associated Methyltransferase 1 CREB : cAMP-responsive element binding protein DMSO : Dimethyl sulfoxide ERK : Extracellular signal-regulated kinase HAT : Histones acétyltransférase HDAC : Histones déacétylase IHDAC : Inhibiteur d'histones déacétylases MAPK : Mitogen-activated protein kinase MPMS : Multiple parallel memory systems MSK1 : Mitogen- and stress-activated kinase NaF : Fluorure de sodium PB : Tampon phosphate (phosphate buffer) PFA : Paraformaldéhyde PCAF : p300/CBP associated factor PKA/PKC : Protéine kinase A/C PLT : Potentialisation à long terme SAHA : Acide suberoylanilide hydroxamique TB : Tampon Tris (tris buffer)

TSA : Trichostatine A

## Liste des figures

#### **INTRODUCTION**

- Figure 1 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire.
- **Figure 2 :** La piscine de Morris, un dispositif comportemental permettant d'évaluer la mémoire spatiale et procédurale.
- **Figure 3 :** Représentation schématique des résultats de l'expérience de McDonald et White (1994) montrant une dissociation entre les effets d'une lésion hippocampique et striatale lors d'une épreuve en piscine de Morris.
- Figure 4 : Le concept de « traitement en parallèle ».
- Figure 5 : Position du striatum et de l'hippocampe dans le cerveau des rongeurs.
- Figure 6 : Connexions intra-hippocampiques du circuit trisynaptique.
- Figure 7 : Différents types d'interactions entre deux systèmes mnésiques.
- Figure 8 : Deux types de consolidation mnésique.
- Figure 9 : Le modèle standard de la consolidation.
- Figure 10 : La théorie des traces multiples.
- **Figure 11 :** Schéma simplifié des voies de signalisation impliquées dans la consolidation cellulaire.
- Figure 12 : Structure d'un nucléosome.
- Figure 13 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN.
- **Tableau 1 :** Les différents types de modifications des histones.
- Figure 14 : Interdépendance des modifications post-traductionnelles des histones.
- Figure 15 : Contrôle du niveau d'acétylation des histones par les histones acétyltransférases et histones déacétylases.
- **Figure 16 :** Classification des HDACs Zn<sup>2+</sup>-dépendantes.
- **Tableau 2 :** Synthèse des travaux montrant l'implication de l'acétylation des histones dans les mémoires hippocampo-dépendantes.
- Figure 17 : Perturbation de l'acétylation des histones au cours du vieillissement normal.

#### MATERIELS ET METHODES

- **Figure 18** : Description des trois protocoles utilisés afin de tester différents types de mémoire en piscine de Morris.
- Figure 19 : Localisation des sites d'injection de TSA au niveau de l'hippocampe dorsal.
- **Tableau 3 :** Synthèse des différents anticorps utilisés en immunohistochimie et immunofluorescence.

#### CHAPITRE I

#### Figure 20 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre I.

#### CHAPITRE II

Figure 21 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre II.

#### CHAPITRE III

Figure 22 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre III.

#### DISCUSSION

- **Figure 23 :** Un traitement chronique au Rolipram améliore les performances spatiales des souris âgées et augmentent les niveaux de H4 acétylée et de CREB phosphorylé.
- **Figure 24 :** Une hypothèse pour expliquer l'augmentation de l'acétylation de H4 par le Rolipram.
- Figure 25 : Une hypothèse pour expliquer l'effet délétère de l'injection intrahippocampique de TSA.

Introduction générale - Les mémoires

## **INTRODUCTION GENERALE**

Introduction générale - Les mémoires

## Partie I : Les mémoires

L'un des grands enjeux des Neurosciences cognitives est de comprendre comment l'activité d'un ensemble de neurones aboutit à la formation de nos souvenirs. Ainsi, le thème central de ma thèse concerne l'identification des mécanismes moléculaires sous tendant la consolidation de différentes formes de mémoire, ainsi que la sélection de stratégies de navigation, en piscine de Morris. En premier lieu, nous décrirons les différents systèmes de mémoire et leurs interactions ainsi que les bases neurobiologiques de la formation d'une trace mnésique. Dans un second temps, nous nous focaliserons sur l'implication des régulations épigénétiques, notamment de l'acétylation des histones, dans la consolidation de la mémoire.

#### I.A. Les systèmes de mémoire

Les études chez l'Homme et chez l'animal ont montré que la mémoire n'est pas une entité unitaire mais un ensemble de modules de stockage appelés systèmes. Chaque système de mémoire se définit à la fois par la nature et la durée de rétention des informations qu'il stocke, ainsi que par la manière dont ces informations sont traitées et, bien sûr, par les structures cérébrales impliquées dans ce traitement. Un des grands enjeux des Neurosciences cognitives a été, et demeure encore aujourd'hui, de caractériser les différents systèmes et de comprendre comment ils interagissent entre eux. La description du cas HM constitue l'origine des classifications actuelles des systèmes de mémoire. Ce patient, dont le cas a été décrit par Scoville et Milner (1957), âgé de 27 ans à l'époque et d'intelligence normale présentait une sévère épilepsie temporale et fut traité par ablation totale et bilatérale du lobe temporal antérieur, constitué de l'hippocampe et des cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique. A la suite de l'opération, HM développa une amnésie antérograde, caractérisée par l'incapacité à former de nouveaux souvenirs à long terme, ainsi qu'une amnésie rétrograde qui l'empêchait de se souvenir d'événements datant de 1 à 10 ans avant l'acte chirurgical. Cependant, les souvenirs très antérieurs à l'opération ainsi que le rappel immédiat étaient préservés. Il était également capable d'apprendre de nouveaux gestes sans se souvenir de les avoir appris (Gabrieli et al., 1993), grâce à des capacités visuo-motrices intactes. L'étude de ce patient a permis d'aboutir à deux conclusions principales :

- L'hippocampe est nécessaire à la formation de nouveaux souvenirs, mais n'est aucunement impliqué dans le rappel des souvenirs anciens.
- Il existe d'autres systèmes de mémoire ne faisant pas intervenir les structures lésées chez HM. En effet, sa mémoire à court terme, ainsi que sa mémoire procédurale, qui lui permet d'apprendre de nouvelles tâches de manière implicite, sont préservées.

Le cas HM, mais aussi l'étude d'autres patients cérébro-lésés ainsi que des expériences lésionnelles chez l'animal et des études d'imagerie chez l'Homme, ont conduit à une classification des systèmes de mémoire permettant de comprendre leur fonctionnement et la manière dont ils interagissent (Sherry et Schacter, 1987; Baddeley, 1988; Tulving, 1995; Squire, 2004).

## I.A.1. Une classification des systèmes de mémoire : le modèle de Squire

En 1992, Larry Squire propose une classification dichotomique de la mémoire à long terme (Squire, 1992; Squire et Knowlton, 1996). Même s'il ne fait pas l'unanimité et si de nouvelles classifications sont toujours proposées (Henke, 2010), ce modèle, actualisé en 2004 (Squire, 2004), reste le plus communément utilisé de nos jours. Il met en opposition deux grands systèmes de mémoire à long terme (Figure 1):

- La mémoire déclarative, explicite, est accessible à la conscience. Elle fait référence à ce que nous appelons communément « mémoire » dans la vie de tous les jours. Elle dépend principalement de l'intégrité du lobe temporal médian et permet le stockage et la récupération intentionnelle des faits personnels ou non. Elle regroupe d'une part la mémoire sémantique (celles des faits publics) et d'autre part la mémoire épisodique (autobiographique). La mémoire épisodique intègre, dans sa définition, le contexte spatio-temporel des événements.
- La mémoire non déclarative, implicite, constitue un système très hétérogène qui regroupe différents apprentissages inconscients. Le fait qu'ils ne dépendent pas de l'hippocampe constitue leur point commun mais ils sont sous-tendus par des processus cognitifs bien différents. Parmi les mémoires implicites, on trouve

notamment la mémoire procédurale, qui concerne l'apprentissage d'habiletés cognitives automatiques et ne requiert pas de conscience permanente des gestes à accomplir. Elle ne nécessite pas l'intégralité de l'hippocampe et dépend du striatum (Squire, 1987).



**Figure 1 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire** (d'après Squire, 1992, 2004). Cette classification associe chaque type d'opération à une structure cérébrale impliquée dans l'encodage des informations.

Cependant, la classification proposée par Squire présente certaines limites. Elle est centrée sur le lobe temporal médian et accorde une grande importance aux structures soustendant les opérations mentales. De plus, elle exclue les interactions possibles entre les différents systèmes de mémoire. Les mémoires épisodique et sémantique y apparaissent très liées tant au plan systémique que fonctionnel, alors qu'il existerait des dissociations fonctionnelles entre elles (Schacter et Tulving, 1994). Enfin, les systèmes de mémoire de la catégorie « non déclarative » forment un ensemble disparate dont le seul point commun est celui de pouvoir fonctionner indépendamment du système déclaratif/hippocampique.

# I.A.2. Théories relatives à la mémoire déclarative et modélisation chez l'animal

La mémoire déclarative est, par définition, une mémoire verbalisable, permettant d'exprimer des souvenirs. Il s'agit donc d'une mémoire exclusivement humaine, ce qui pose une difficulté évidente en vue de la transposition aux études chez l'animal. Deux stratégies peuvent être mises en œuvre afin de la modéliser chez l'animal. La première vise à réduire la mémoire déclarative à ses propriétés élémentaires, sans tenir compte de ses capacités de verbalisations. La seconde consiste en l'étude de la fonction de l'hippocampe, structure cérébrale sous-tendant ce type de mémoire.

#### a) La mémoire « episodic-like » chez l'animal

Comme nous l'avons mentionné, la mémoire déclarative regroupe la mémoire épisodique et la mémoire sémantique. La mémoire épisodique requiert la possibilité d'un «voyage mental» dans le temps et dans l'espace (Wheeler et al., 1997; Roberts, 2002; Tulving, 2002), cette capacité étant propre à l'Homme. Afin de la modéliser chez l'animal, plusieurs auteurs l'ont réduite à ses plus simples caractéristiques en définissant une mémoire « episodic-like » (Morris, 2001). L'étude de la mémoire épisodique chez l'animal teste la capacité de certaines espèces à manipuler le quoi? (quel événement a eu lieu?), le où ? (à quel endroit est-il survenu ?) et le quand ? (à quel moment a-t-il eu lieu ?) d'un épisode récent. Dans cette optique, les travaux de Clayton sur le comportement de cache de la nourriture chez le geai montrent que cette espèce est capable d'intégrer ces trois dimensions (Clayton et Dickinson, 1998; Griffiths et al., 1999; Clayton et al., 2003). Ces recherches révèlent la capacité de ces oiseaux à utiliser des données qualitatives, spatiales et temporelles d'une manière flexible. Plus récemment, des expériences réalisées en labyrinthe radiaire démontrent que le rat est également capable de manipuler le quoi ?, le où ? et, de manière controversée (Bird et al., 2003), le quand ? de l'épisode mémorisé (Babb et Crystal, 2006a, b; Nagshbandi et al., 2007). Un paradigme comportemental permettant d'évaluer la mémoire « episodic-like » chez le rongeur est le test de la reconnaissance d'objet. Lors de la séance d'entrainement, les animaux sont mis en présence de deux objets. La séance de test permet de mesurer la capacité des animaux à manipuler le quoi ?, pour cela, l'un des objets est remplacé

par un objet jamais présenté. L'animal sera alors tenté d'explorer ce nouvel objet. Une autre version du test permet de tester la capacité à tester le *où* ? Pour cela, ce n'est pas l'objet en lui-même qui est changé, mais sa localisation (Dere *et al.*, 2005).

#### b) La théorie relationnelle

Selon Cohen, la mémoire déclarative offre la capacité de **comparer et de contraster** des informations acquises séparément, alors que les apprentissages procéduraux aboutissent à l'acquisition d'habiletés, mais n'autorisent aucune extrapolation à une nouvelle situation (Cohen, 1984). A partir de cette définition, Eichenbaum, élabore sa « théorie relationnelle », qui propose de rassembler certaines formes d'apprentissages chez l'Homme comme chez l'animal sous le terme « mémoire relationnelle » (Eichenbaum *et al.*, 1988; Eichenbaum *et al.*, 1989). La mémoire relationnelle se définit par une intégration des relations entre items permettant une expression comportementale **flexible** dans des situations nouvelles. Pour Eichenbaum, chaque épisode est intégré dans un réseau relationnel et chacune de ses caractéristiques est comparée à celle des épisodes préalablement vécus par l'individu. Ainsi, une partie d'un souvenir (ou un souvenir en particulier) peut être réactivé dans des contextes variés. Les informations encodées sont donc traitées de manière flexible.

La théorie relationnelle permet de faciliter la modélisation de la mémoire déclarative en définissant une mémoire relationnelle chez l'animal. Ainsi, des tests comportementaux évaluant la capacité d'un animal à comparer et contraster des informations ont été développés, notamment le paradigme comportemental en labyrinthe radiaire modélisant la mémoire relationnelle/déclarative chez la souris (Marighetto *et al.*, 1999). Plusieurs études ont démontré la nécessité de l'intégrité de l'hippocampe dans l'utilisation flexible d'informations (Eichenbaum *et al.*, 1990; Marighetto *et al.*, 1999; Etchamendy *et al.*, 2003; Mingaud *et al.*, 2007). En effet, sa position particulière dans le cerveau et ses nombreuses afférences en provenance des cortex associatifs lui conféreraient un rôle d'intégrateur (Eichenbaum, 1999; Shohamy et Wagner, 2008).

#### c) L'hippocampe et la théorie des cartes spatiales

Une autre approche visant à modéliser la mémoire déclarative chez l'animal consiste en la compréhension du fonctionnement de la structure constituant le substrat de ce type de mémoire. Dans ce contexte, des données lésionnelles et surtout des données électrophysiologiques, provenant d'enregistrements de l'activité unitaire chez l'animal libre de se déplacer, ont permis à O'Keefe et Nadel de formuler l'hypothèse selon laquelle l'hippocampe jouerait un rôle clé dans l'encodage et le stockage des informations spatiales et permettrait d'établir une carte cognitive (O'Keefe et Nadel, 1978). Ces enregistrements montrent que certaines cellules pyramidales de l'hippocampe, appelées cellules de lieu, présentent des caractéristiques de décharge en rapport avec la position de l'animal dans son environnement (O'Keefe et Dostrovsky, 1971). Les cellules de lieu sont présentes dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal et, dans une moindre mesure, dans l'hippocampe ventral (Jung et al., 1994; Poucet et al., 1994). Chaque cellule possède un champ d'activité (espace dans lequel une cellule s'active) stable lorsque l'environnement est fixe. Elles sont activées dans ce champ d'activité, indépendamment du comportement de l'animal ou du temps passé dans cette zone (Poucet et al., 2003). Lorsqu'une rotation de l'environnement est effectuée, le champ d'activité suit la rotation.

Afin de démontrer le rôle de ces cellules de lieu dans la navigation et la mémoire spatiale, des études ont examiné l'effet d'une détérioration des propriétés de ces cellules. Dans des expériences utilisant, par exemple, des rotations de l'environnement, l'induction d'une incohérence entre le positionnement du champ d'activité des cellules de lieu et la tâche spatiale entraine une perturbation des performances chez le rat (Lenck-Santini *et al.*, 2001; Lenck-Santini *et al.*, 2002). Ainsi, les cellules de lieu contribuent à l'élaboration d'une carte spatiale de l'environnement dans lequel évolue l'animal. Cette carte spatiale permet aux animaux d'associer les principaux éléments d'un environnement et leurs positions relatives et d'utiliser ces informations d'une manière flexible. Une lésion de l'hippocampe détruit ces capacités (Morris *et al.*, 1982; Packard et McGaugh, 1992), alors que les stratégies de guidage par indice sont préservées. Cette théorie a permis le développement de nombreuses tâches, dites spatiales, utilisées pour étudier la fonction hippocampique, c'est-à-dire l'équivalent de la mémoire déclarative chez l'animal (Pour revue, Sharma *et al.*, 2010).

#### d) <u>Le dispositif de la piscine de Morris</u>

L'une des tâches communément utilisées chez le rongeur pour la modélisation de la mémoire déclarative/relationnelle est une tâche aversive réalisée en labyrinthe aquatique de Morris. Si l'on prend en compte les trois théories de la mémoire développées dans ce chapitre (mémoire « episodic-like », théorie des cartes spatiales et théorie relationnelle), le paradigme de la piscine de Morris (Morris et al., 1982) apparait approprié comme modèle de la mémoire hippocampo-dépendante. Cette tâche présente l'avantage de ne pas nécessiter de privation alimentaire. Le dispositif consiste à dissimuler une plateforme servant de refuge dans un bassin circulaire rempli d'eau opaque. Le test repose sur la motivation aversive de l'animal qui doit apprendre, au cours des essais successifs, à localiser la plateforme grâce aux indices disponibles dans la pièce expérimentale (Morris, 1984). Les animaux subissent une période d'apprentissage, composée d'un nombre variable d'essais, durant laquelle leur performance est évaluée par la mesure du temps écoulé avant d'atteindre la plateforme. Ce paramètre pouvant être influencé par des problèmes sensorimoteurs, la distance parcourue avant d'arriver à la plateforme est également évaluée. La diminution de ces paramètres au fil des essais atteste de l'apprentissage de la tâche. Une phase « test » est classiquement mise en œuvre suite à l'acquisition de la tâche afin d'évaluer la force du rappel de la localisation de la plateforme, cette dernière étant retirée du bassin. Différents paramètres sont examinés, tels que le temps passé et la distance parcourue dans le quadrant cible de la piscine ou, plus précisément, dans la zone avant contenu la plateforme lors de l'apprentissage. Le nombre d'entrées dans la zone cible peut également être évalué.

Le test comportemental de la piscine de Morris présente l'avantage de pouvoir révéler des dissociations entre des formes de mémoire dépendantes ou non de l'hippocampe. En effet, plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre par l'animal afin de localiser un but dans un environnement invariant. Parmi celles-ci :

- la stratégie allocentrique (ou spatiale), est basée sur l'intégration des relations existant entre les différents indices visuels de l'environnement. Elle est très flexible et requiert l'établissement d'une carte spatiale.

- La stratégie de guidage (ou indicée) consiste en l'association entre la localisation de la plateforme et un indice visuel présent sur elle. Cette stratégie est utilisée lorsque la plateforme est visible depuis le point de départ.
- la stratégie égocentrique nécessite l'apprentissage d'une séquence de mouvements conduisant à la plateforme (Moghaddam et Bures, 1996). Ces deux dernières stratégies sont moins flexibles et sont associées à une mémoire procédurale du fait qu'elles requièrent la mise en place d'automatismes moteurs.

Lors d'un apprentissage en piscine de Morris, ces différentes stratégies peuvent être acquises de manière simultanée et coexister. Ainsi, des rats entrainés à localiser une plateforme fixe et visible sont capables, lors d'un test avec plateforme invisible, de retrouver cette dernière par l'utilisation des indices distaux présents dans l'environnement (Whishaw et Mittleman, 1986).

Afin de dissocier l'apprentissage de ces différentes stratégies, plusieurs protocoles ont été développés en piscine de Morris. Lors d'un **apprentissage spatial** (plateforme invisible), la plateforme est fixe et le point de départ des animaux varie d'un essai à un autre. L'animal doit se repérer grâce aux indices distaux. Cette version de l'épreuve permet donc de tester la capacité des animaux à comparer des items dans un cadre spatial invariant et à associer une récompense (*quoi* ? la plateforme) à un emplacement précis de l'environnement (*où* ?), ce qui dépend de l'intégrité de l'hippocampe et en fait un modèle de mémoire déclarative/relationnelle chez l'animal (Figure 2, Morris *et al.*, 1982; Packard et McGaugh, 1992; Schroeder *et al.*, 2002; Porte *et al.*, 2008b). A l'inverse, **l'apprentissage indicé** (plateforme visible ou marquée par un indice) nécessite la mise en place d'une stratégie de guidage. En effet, dans cette version du protocole, la localisation de la plateforme ainsi que le point de départ des animaux varient à chaque essai. Les animaux se dirigent vers la plateforme grâce à l'indice situé sur elle. Cet apprentissage procédural requérant la mise en place d'automatismes est, quant à lui, sous le contrôle majeur du striatum dorsal (Figure 2, Packard et McGaugh, 1992; Devan *et al.*, 1996).



Figure 2 : La piscine de Morris, un dispositif comportemental permettant d'évaluer la mémoire spatiale et procédurale. Les souris apprennent à localiser une plateforme immergée dans de l'eau opaque (matérialisée par les pointillés). La plateforme peut être fixe et invisible, la souris doit alors se servir des indices présents dans l'environnement (stratégie spatiale, à gauche). Les croix représentent les points de départ. Dans la deuxième version du test, la plateforme est indicée et sa localisation varie, les souris doivent alors utiliser exclusivement l'indice situé en son centre afin de s'échapper du bassin (stratégie indicée, à droite).

#### I.A.3. Les interactions entre systèmes de mémoire

### a) <u>La double dissociation : émergence de la notion d'interactions</u> <u>entre systèmes mnésiques</u>

Si l'on revient au cas HM, ce patient présente une amnésie antérograde alors que ses capacités d'acquisition d'habiletés motrices, ne faisant pas l'objet d'un rappel conscient, sont préservées. Ceci met en évidence l'existence de différents systèmes de mémoire dépendants de régions cérébrales distinctes. Les études lésionnelles chez l'animal, visant à l'identification des structures sous-tendant les mémoires déclarative et non déclarative, ont mis en valeur le rôle spécifique de **l'hippocampe dorsal** dans des tâches faisant intervenir la **mémoire relationnelle** en labyrinthe radiaire (Packard *et al.*, 1989; McDonald et White, 1993; Etchamendy *et al.*, 2003) et en piscine de Morris (Morris *et al.*, 1982; Packard et McGaugh, 1992; Packard et Teather, 1997a; Schroeder *et al.*, 2002). Le **striatum dorsal**, quant à lui est indispensable pour l'acquisition de **tâches procédurales** en labyrinthe radiaire (Packard *et al.*, 1989; McDonald et White, 1993) comme en piscine de Morris (Whishaw *et al.*, 1987;

Packard et McGaugh, 1992; Packard et Teather, 1997b). De plus, les études d'imagerie se focalisant sur l'activation/phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) ou l'induction de la protéine Fos viennent confirmer l'implication de l'hippocampe dans le traitement d'informations spatiales (Colombo *et al.*, 2003; Touzani *et al.*, 2003; Porte *et al.*, 2008b; Sung *et al.*, 2008) alors que le striatum est impliqué dans des formes de mémoires procédurales (Colombo *et al.*, 2007).

Afin de dissocier les systèmes sous-tendant les mémoires déclarative (et plus précisément la mémoire spatiale) et procédurale, des auteurs ont élaboré des protocoles durant lesquels les animaux sont soumis à des situations conflictuelles devant être résolues par une stratégie spatiale/relationnelle hippocampo-dépendante et par une stratégie de guidage striatum-dépendante (McDonald et White, 1994; Devan *et al.*, 1999; Devan et White, 1999).

Par exemple, lors d'une procédure développée en piscine de Morris, des rats sont soumis à des essais « spatiaux » (plateforme immergée) et « indicés » (plateforme visible) (McDonald et White, 1994). Ainsi, ils mettent en œuvre deux stratégies différentes pour atteindre la plateforme : (1) lorsque la plateforme est invisible, ils associent sa position aux indices de l'environnement (stratégie spatiale ou allocentrique) et (2) lorsque la plateforme est émergée, ils peuvent directement la localiser grâce à une stratégie de guidage (ou indicée). Lors d'un test de compétition où la plateforme est déplacée et reste visible, les auteurs ont montré que des rats non lésés utilisent à parts égales l'une ou l'autre des stratégies. En revanche, des rats porteurs d'une lésion de l'hippocampe se dirigent préférentiellement vers la nouvelle plateforme indicée, alors que ceux lésés au niveau du striatum dorsal favorisent la mise en place d'une stratégie spatiale, en explorant l'emplacement de l'ancienne plateforme (Figure 3).

L'existence d'une telle dissociation met en lumière la notion d'antagonisme fonctionnel entre structures mnésiques. D'après cette théorie, lorsqu'un apprentissage sollicite deux structures, l'inhibition de l'une favorise le fonctionnement de l'autre. De la même façon, la suractivation d'une région cérébrale conduit à l'utilisation préférentielle de la stratégie cognitive reposant sur cette structure.



Figure 3 : Représentation schématique des résultats de l'expérience de McDonald et White (1994) montrant une dissociation entre les effets d'une lésion hippocampique et striatale lors d'une épreuve en piscine de Morris. La piscine de Morris est placée dans une pièce présentant divers indices distaux. L'apprentissage comprend des essais avec plateforme visible (à gauche) et des essais avec plateforme invisible (à droite), en alternance. Les animaux doivent donc apprendre deux stratégies, l'une de guidage, l'autre reposant sur l'établissement d'une carte spatiale. Lors de l'essai-test, la plateforme change de localisation et reste visible. Des animaux intacts sont capables d'utiliser l'une ou l'autre des stratégies. Les rats présentant une lésion de l'hippocampe nagent préférentiellement vers la plateforme émergée alors que les animaux dont le striatum dorsal est lésé cherchent à l'emplacement initial de la plateforme et utilisent donc une stratégie spatiale.

## b) <u>La théorie du fonctionnement multiple et parallèle des systèmes</u> (Multiple Parallel Memory Systems, MPMS)

Les travaux de White et McDonald (2002), qui synthétisent les données obtenues chez l'animal quant aux interactions pouvant exister entre systèmes, ont conduit à l'établissement de la théorie du fonctionnement multiple et parallèle des systèmes de mémoire (« Multiple Parallel Memory Systems » ou MPMS). Sans exclure la présence d'autres structures, les auteurs se concentrent sur trois systèmes principaux :

- Le système hippocampique traite les associations stimulus-stimulus. L'hippocampe est indispensable à l'encodage d'informations nécessaires à l'établissement de cartes cognitives spatiales et est capable d'associer ces cartes spatiales à des événements particuliers (notamment à des récompenses, comme une plateforme d'échappement dans le cas de la piscine de Morris) survenant dans cet environnement. L'état affectif lié à l'administration d'une récompense ou d'une punition n'est intégré par l'hippocampe que comme un stimulus faisant partie de l'ensemble des représentations relationnelles entre les stimuli.
- Le système striatal associe simplement un stimulus (par exemple un indice présent sur une plateforme) à une réponse motrice (se diriger vers la plateforme, association stimulus-réponse). La contiguïté entre le stimulus et le renforcement est cruciale lors de l'établissement de l'association. Cependant, l'entrainement aboutira à une réponse inconsciente et habituelle et, au fur et à mesure de l'apprentissage, l'absence de renforcement ne perturbera plus l'expression du comportement.
- Le système amygdalien encode les associations stimulus-renforcement, positif ou négatif. L'amygdale met en relation un état affectif à un instant t avec des événements se produisant au même moment. Ici, le renforcement est capital puisque s'il est absent, le comportement s'éteindra.

Selon la théorie MPMS (White et McDonald, 2002), chacun des trois systèmes décrits reçoit des informations similaires mais les traite selon des mécanismes opératoires différents (Figure 4). Ces systèmes sont activés en même temps et **fonctionnent en parallèle** au début d'un apprentissage pour permettre l'encodage des items selon les trois modes d'associations. La sélection du système prépondérant pour la réponse se fera ensuite par évaluation de la pertinence du type d'association afin d'exprimer un comportement adapté. Chaque situation d'apprentissage serait alors caractérisée par une configuration particulière d'activité au sein de ces trois systèmes.

Même si leur théorie n'est pas incompatible avec la notion de dichotomie entre systèmes de mémoire, White et McDonald évoquent la possibilité d'interactions entre ces systèmes. Bien qu'ayant des compétences distinctes, ces derniers ne sont pas indépendants et peuvent interagir en coopération ou en compétition. La connectivité anatomique directe ou indirecte existant entre les trois structures évoquées au-dessus et la présence de structures de

plus haut niveau (notamment le cortex préfrontal) recevant des projections de ces différents systèmes confortent cette hypothèse. Avant d'exposer les différentes données permettant de valider l'existence de ces interactions entre systèmes de mémoire, nous décrirons, ci-dessous, les principales relations anatomiques entre les systèmes hippocampique et striatal, qui représentent l'objet de notre étude.



**Figure 4 : Le concept de « traitement en parallèle »** (d'après White et McDonald, 2002). L'hippocampe permet l'encodage des relations stimulus-stimulus (S-S), le striatum dorsal gère les associations simples de type stimulus-réponse (S-R) et l'amygdale encode les relations stimulus renforcement (S-Rf).

#### c) <u>Relations anatomiques entre hippocampe et striatum</u>

La formation hippocampique comprend l'hippocampe, le cortex entorhinal (structure d'entrée) et le subiculum (structure de sortie). Elle est associée aux cortex périrhinal et parahippocampique, qui constituent les principales voies d'entrées des informations en provenance des aires associatives néocorticales (Lavenex et Amaral, 2000). L'ensemble de ces structures forme le lobe temporal médian. En coupe frontale, l'hippocampe présente deux structures en U inversé (Figure 5), qui sont le gyrus denté et la corne d'Ammon, elle-même subdivisée en trois Champs Ammoniques CA1, CA2 et CA3 (Figure 6, Ramon Y Cajal, 1911).





L'hippocampe présente un profil particulier de connexions intrinsèques reliant l'ensemble des régions le composant. Ce réseau décrit pour la première fois par le neuroanatomiste Ramón Y Cajal, en 1911 a été qualifié de **circuit trisynaptique** (Figure 6). Les cellules granulaires du gyrus denté reçoivent des entrées du cortex entorhinal, ce qui constitue la voie perforante (Witter, 2007), puis projettent sur les cellules du CA3 *via* les fibres moussues. Les cellules pyramidales du CA3 émettent, à leur tour, des projections nommées collatérales de Schaffer vers les cellules du CA1. Il existe également des connexions locales régies par des interneurones et des connexions CA3-CA3 par les fibres récurrentes. Cette activité récurrente au sein du CA3 joue un rôle important, notamment dans l'acquisition rapide d'informations (Rolls et Kesner, 2006). Enfin, les cellules pyramidales du CA1 projettent vers le subiculum, constituant ainsi la voie de sortie du circuit.



**Figure 6 : Connexions intra-hippocampiques du circuit trisynaptique.** Le cortex entorhinal (Ent) contacte le gyrus denté (GD) *via* la voie perforante (VP). Le GD projette vers la couche pyramidale CA3 *via* les fibres moussues (FM). Les neurones du CA3 contactent alors le CA1 par les collatérales de Schaffer (CS). Les projections du CA1 vers le subiculum constituent la voie de sortie du circuit.

Le striatum, quant à lui, est divisé en deux régions fonctionnellement distinctes : le striatum dorsal et le striatum ventral (ou noyau accumbens). Le striatum ventral est au cœur du circuit de la récompense et joue un rôle majeur dans la dépendance aux drogues. Le striatum dorsal, quant à lui, présente un intérêt majeur pour notre étude puisqu'il est impliqué dans les apprentissages de type procédural. Il est lui-même séparé en deux composantes par la capsule interne : le noyau caudé et le putamen, fusionnés chez le rongeur et distinct l'un de l'autre chez le primate.
L'hippocampe et le striatum dorsal sont fortement connectés, notamment par l'intermédiaire du cortex préfrontal. En effet, l'hippocampe reçoit, *via* le cortex entorhinal des projections des aires corticales sensorielles associatives (Amaral et Witter, 1995). En retour, il projette vers un ensemble de structures sous-corticales dont le septum latéral, le noyau accumbens et le striatum dorso-median (Sorensen et Witter, 1983), ainsi que vers le cortex préfrontal (Swanson et Kohler, 1986).

Le striatum dorsal reçoit un ensemble de projections convergeant des aires sensorielles et motrices du néocortex. L'une des principales efférences en provenance du striatum se dirige vers le thalamus antérieur qui projette à son tour vers le cortex préfrontal (Graybiel, 1995).

Malgré l'existence de ces données neuroanatomiques, les expériences se sont longtemps restreintes à une étude séparée des deux structures, négligeant souvent les interactions existant entre systèmes de mémoire.

# d) <u>Données expérimentales en faveur de l'existence d'interactions</u> entre systèmes hippocampique et striatal

La possibilité d'interactions entre les structures cérébrales impliquées dans des apprentissages spécifiques est étayée par de nombreuses expériences de lésions ou d'inactivations. Pour une situation expérimentale donnée, les interactions entre systèmes de mémoire se manifestent sous forme d'indépendance, d'opposition ou de synergie (coopération). Il a également été observé que la nature de ces interactions peut changer au cours d'un apprentissage (Jaffard et Meunier, 1993; Kim et Baxter, 2001; White et McDonald, 2002; Poldrack et Packard, 2003; Ghiglieri *et al.*, 2011).

#### • Coopérations entre systèmes hippocampique et striatal

Lors d'une situation d'apprentissage où l'utilisation de l'un ou l'autre des systèmes de mémoire aboutit à la mise en place d'un comportement permettant la résolution de la tâche, il semble que la coopération entre ces deux systèmes soit plus adaptée que l'utilisation compartimentée de deux structures cérébrales (Figure 7). Chez l'animal, une inactivation pharmacologique ou une lésion neuroanatomique, soit de l'hippocampe, soit de la partie dorso-médiane du striatum, perturbe l'acquisition d'un apprentissage spatial (Devan *et al.*,

1996; Devan *et al.*, 1999; Devan et White, 1999; De Leonibus *et al.*, 2003). De la même manière, chez l'Homme, une atteinte du lobe temporal médian retarde l'acquisition d'une tâche procédurale (Beaunieux *et al.*, 2006). Des données obtenues au laboratoire ont montré que la stimulation des adénylate cyclases (AC) hippocampiques, par l'administration de forskoline durant la phase tardive de consolidation, améliore les performances de souris dans des tâches dépendantes du striatum (Martel *et al.*, 2006). Ces quelques exemples traduisent donc l'interdépendance des systèmes hippocampique et striatal. Il apparait également nécessaire de considérer le striatum dorsal comme une structure fonctionnellement hétérogène, avec une partie latérale impliquée dans les associations simples de type stimulus-réponse et une partie médiane coopérant avec l'hippocampe pour l'établissement d'associations plus complexes de type stimulus-stimulus.

#### • Compétition entre systèmes hippocampique et striatal

À partir de données démontrant que la lésion ou l'inactivation de la formation hippocampique peut faciliter l'aptitude à acquérir les apprentissages procéduraux, Jaffard et Meunier (1993) ont proposé l'existence d'interactions compétitives entre les systèmes cérébraux qui sous tendent la mémoire procédurale et le fonctionnement d'une mémoire hippocampo-dépendante (Figure 7). Chez l'animal, des expériences réalisées en labyrinthe en croix ou en piscine de Morris montrent que des inactivations transitoires ou des lésions de l'hippocampe facilitent l'acquisition d'apprentissages procéduraux par ailleurs sévèrement perturbés par des lésions du striatum, alors que celles du striatum favorise une stratégie spatiale (McDonald et White, 1994; Packard et McGaugh, 1996; Schroeder *et al.*, 2002; Chang et Gold, 2003b; Martel *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Gastambide *et al.*, 2009). De plus, d'autres données montrent que, dans un test en labyrinthe en croix permettant l'utilisation de deux stratégies différentes, la stimulation de l'hippocampe après injection post-apprentissage de glutamate perturbe l'acquisition d'une stratégie procédurale alors que celle du striatum favorise la stratégie procédurale, au détriment de la stratégie spatiale (Packard, 1999).

L'ensemble de ces expériences suggère que des informations acquises par un système (par exemple l'hippocampe) peuvent interférer avec l'acquisition des informations par d'autres systèmes cérébraux (striatum, amygdale).

#### • Différents facteurs modulent les interactions entre systèmes de mémoire

Plusieurs facteurs peuvent moduler ces interactions et en premier lieu, on peut citer le niveau d'entrainement (Iaria et al., 2003). Par exemple, dans une épreuve en labyrinthe en croix dans laquelle la mise en place d'une stratégie procédurale ou spatiale conduit de façon identique à une réponse adaptée, le niveau d'entrainement s'accompagne d'un changement de stratégie cognitive : spatiale après 8 jours d'apprentissage puis procédurale après 16 jours d'apprentissage (Packard et McGaugh, 1996; Packard, 1999; Chang et Gold, 2003a). Ces données ont été confirmées par des études chez l'Homme montrant que l'hippocampe intervient de façon temporaire dans des épreuves de mémoire procédurale (Poldrack et al., 2001). En utilisant un test de compétition en piscine de Morris, permettant de dissocier les deux stratégies, indicée/procédurale et spatiale, une étude menée au laboratoire a également démontré l'importance du niveau d'apprentissage dans la sélection du (ou des) système(s) de mémoire adapté(s) à la tâche effectuée. En effet, au début de l'apprentissage (4 essais), les souris élaborent une stratégie indicée et à ce stade, une coopération est observée entre l'hippocampe et le striatum. Lorsque la tâche est maitrisée (12 essais), une stratégie spatiale est sollicitée et les deux structures entre en compétition. Enfin, après un sur-apprentissage (22 essais), les deux stratégies sont utilisées indifféremment et l'hippocampe n'est plus activé (Martel et al., 2007).

Une **pré-exposition au contexte** peut également influencer les interactions entre systèmes, en favorisant la sélection d'une stratégie spatiale (Martel *et al.*, 2007; Tunur *et al.*, 2010).

Ces interactions entre systèmes de mémoire peuvent également être perturbée par le **vieillissement**, qu'il soit normal ou pathologique. Des expériences utilisant le test de compétition en piscine de Morris montrent que des souris âgées (Nicolle *et al.*, 2003) ou modèles de la maladie d'Alzheimer (Blanchard *et al.*, 2008) favorisent une stratégie indicée, quelque soit le niveau d'apprentissage.

L'ensemble des conceptions actuelles s'accorde sur le fait que ces processus d'interactions représentent un mécanisme adaptatif grâce auquel un organisme peut optimiser sa performance comportementale et minimiser sa dépense énergétique en sélectionnant le ou les systèmes de mémoire adaptés à la situation rencontrée.

39



**Figure 7 : Différents types d'interactions entre deux systèmes mnésiques** (adapté de Ghiglieri *et al.*, 2011). Les systèmes hippocampique et striatal peuvent être activés indépendamment l'un de l'autre. L'hippocampe permet l'acquisition d'expériences et de concepts, tandis que le striatum permet d'acquérir des automatismes et des habiletés. Ces deux systèmes peuvent également interagir, en coopération ou en compétition, en fonction de la demande de la tâche. La coopération se met en place lorsque les deux systèmes peuvent conduire à une solution alors qu'une compétition aura lieu afin d'aboutir à la sélection de la solution la plus adaptée lorsque les deux systèmes apportent des réponses conflictuelles.

# I.B. Mécanismes neurobiologiques de la consolidation mnésique

La formation de nos souvenirs n'est pas un processus instantané. Les mémoires récentes nécessitent du temps pour se stabiliser et sont souvent sujettes aux interférences qui se manifestent sous la forme de stimuli distracteurs, de blessures ou de toxines. La formation d'une trace mnésique implique une phase de consolidation, qui correspond au passage d'une mémoire à court terme, récente, fragile et labile, à une mémoire à long terme, plus stable et durable. Dès 1968, Atkinson et Schiffrin proposent un modèle dans lequel les informations sensorielles passent d'un **stockage à court terme à un stockage à long terme** par l'intermédiaire d'une étape de consolidation (Atkinson et Shiffrin, 1968). Même si ce modèle n'est plus d'actualité, la description de cette étape de consolidation est le fruit d'actives recherches et discussions dans le domaine des Neurosciences.

Historiquement, le terme « consolidation » a été adopté pour la première fois par Müller et Pilzecker (1900), qui ont remarqué, suite à une série d'études, que le souvenir d'une information peut être perturbé si un nouvel apprentissage intervient dans les minutes qui suivent le premier, créant ainsi une interférence. Selon ces auteurs, ce phénomène pourrait refléter un intervalle post-entrainement durant lequel l'apprentissage se consolide dans la mémoire. Environ 20 ans avant l'introduction du terme « consolidation », Ribot est le premier à suggérer que les mémoires pourraient être graduellement réorganisées dans le temps. Il décrit que les pertes de mémoire survenant après des dommages cérébraux sont souvent liées à l'âge de la mémoire. Ce gradient d'amnésie rétrograde, connu sous le nom de « loi de Ribot » (Ribot, 1881), suggère qu'il existe un processus de réorganisation mnésique délai-dépendant, au niveau anatomique.

La considération de ces deux phénomènes amène à une constatation importante : alors que la loi de Ribot repose sur l'existence d'un gradient d'amnésie rétrograde sur plusieurs jours (voire des années), Müller et Pilzecker définissent la consolidation sur la base d'une sensibilité de la mémoire aux interférences rétroactives dans les minutes suivant l'apprentissage. Il existerait donc plusieurs dimensions temporelles au terme de consolidation. Ainsi, Y. Dudai (Dudai et Morris, 2000; Dudai, 2004) distingue une consolidation « systémique », faisant appel à des phénomènes lents (jours, années) décrits au niveau structurel, d'une consolidation « cellulaire » (ou moléculaire ou synaptique), faisant référence à des phénomènes plus rapides (dans les heures qui suivent l'acquisition) et survenant à l'échelle neuronale (Figure 8). De nombreuses expériences ont montré que la consolidation cellulaire est sensible à l'injection d'inhibiteurs de la synthèse protéique dans les minutes qui suivent l'apprentissage. Elle se distingue de la consolidation systémique, sensible à une lésion de l'hippocampe dans les premiers jours suivant l'acquisition. Ainsi, la consolidation systémique correspond à la réorganisation, au cours du temps, des circuits cérébraux ou des systèmes qui supportent la mémoire. La consolidation cellulaire, quant à elle, fait référence aux mécanismes neuronaux impliqués dans la formation de la mémoire. Par la suite, nous décrirons ces deux phénomènes, en portant un intérêt particulier à la consolidation cellulaire, point central des études présentées dans cette thèse.



Figure 8: Deux types de consolidation mnésique (adapté de Dudai. 2004). La consolidation cellulaire (à gauche), ayant un décours temporel de l'ordre de la minute. est caractérisée par sa sensibilité aux inhibiteurs de synthèse consolidation protéique. La systémique (à droite) est déterminée en fonction de la sensibilité de la mémoire à long terme à la lésion hippocampique. Son décours temporel est plus lent, de l'ordre du mois.

# I.B.1. La consolidation systémique : hypothèse classique et théorie des traces multiples

Les souvenirs anciens semblent moins altérés que les souvenirs récents suite à une lésion de l'hippocampe, ce qui suggère l'existence d'une consolidation à très long terme (ou systémique). Elle commence juste après l'apprentissage mais, à la différence de la consolidation cellulaire, le processus de conservation des souvenirs sous une forme durable demande quelques semaines, voire des mois, et peut impliquer de nouvelles aires cérébrales indépendantes de celles concernant l'acquisition. Une fois transférés dans la mémoire à long terme, les souvenirs cessent d'être labiles et échappent ainsi à l'action de traitements amnésiants dans l'hippocampe.

#### a) La théorie standard

La théorie standard de la consolidation systémique (Alvarez et Squire, 1994; Squire et Alvarez, 1995) stipule que le stockage et la restitution d'une trace mnésique sont initialement sous-tendus par des **circuits hippocampo-corticaux** activés lors de l'encodage (Dudai, 2004). Les réseaux neuronaux corticaux impliqués semblent s'activer sous l'influence de l'hippocampe. Un postulat majeur de cette théorie est que l'hippocampe aurait un rôle d'intégrateur et dirigerait le processus en modulant graduellement l'organisation des réseaux corticaux ayant pris en charge la trace mnésique. Au final, ceux-ci renforceraient leurs interconnexions, rendant la trace progressivement indépendante de l'hippocampe lors du

rappel (Figure 9). L'engagement de l'hippocampe serait donc temporaire. La vitesse de formation des représentations mnésiques au sein de ces réseaux diffère. Elle est de l'ordre de quelques heures au sein de l'hippocampe, du fait de changements synaptiques rapides et semble servir de stockage temporaire de l'information. La formation des représentations au niveau cortical est beaucoup plus longue, les changements synaptiques étant plus lents (Squire et Alvarez, 1995; Frankland et Bontempi, 2005).



**Figure 9 : Le modèle standard de la consolidation** (d'après Frankland et Bontempi, 2005). L'hippocampe intègre rapidement les informations représentant les différentes caractéristiques d'un épisode, pour former rapidement une trace mnésique cohérente. Ces informations sont encodées dans différents circuits corticaux. Les réactivations successives du réseau hippocampo-cortical conduisent à renforcer progressivement les connexions cortico-corticales. Ce renforcement permettra à cette trace mnésique de devenir indépendante de l'hippocampe.

Cette théorie a initialement permis d'expliquer les cas d'amnésies rétrogrades temporellement graduées, observées chez des patients atteints de lésions restreintes à l'hippocampe (MacKinnon et Squire, 1989; Squire et Alvarez, 1995), notamment le cas de HM dont l'amnésie rétrograde remonte à environ 11 ans. Elle a également été confirmée chez d'autres patients KC et EP, avec une atteinte massive du lobe temporal médian, qui peuvent parfaitement se diriger d'un point à l'autre de l'environnement dans lequel ils ont grandi, mais qui sont incapables de se diriger dans leur environnement actuel (Teng et Squire, 1999; Rosenbaum *et al.*, 2000). Par ailleurs, des études ont montré que l'activité du lobe temporal médian lors de la récupération de souvenirs de nature sémantique chez des sujets sains

diminue avec le temps alors que celle des lobes frontaux augmente (Haist *et al.*, 2001; Douville *et al.*, 2005; Smith et Squire, 2009).

De nombreuses études, chez l'animal, basées sur des méthodes et des tâches différentes ont été effectuées pour vérifier cette théorie. Des lésions de l'hippocampe chez le primate (Zola-Morgan et Squire, 1990) ou le rongeur (Winocur, 1990; Cho *et al.*, 1993; Ramos, 1998) perturbent les souvenirs récents sans affecter les souvenirs anciens (Pour revue, Squire et Bayley, 2007). Des travaux couplant des inactivations réversibles de l'hippocampe à des techniques d'imagerie ont montré, dans une tâche spatiale en labyrinthe radiaire chez la souris, un désengagement de l'activité hippocampique avec le temps et, en parallèle, une augmentation de l'activité de structures corticales (cortex préfrontal et cortex cingulaire antérieur) à long terme (Bontempi *et al.*, 1999; Maviel *et al.*, 2004). Ces résultats ont été répliqués dans d'autres tâches. Par exemple, dans une procédure de conditionnement de peur chez la souris, Restivo *et al.* (2009b) ont montré que la densité des épines dendritiques diminue au cours du temps dans le champ CA1 alors qu'elle augmente dans le cortex cingulaire antérieur.

#### b) La théorie des traces multiples

La théorie de traces multiples s'accorde avec la théorie classique sur l'existence d'un dialogue hippocampo-cortical au cours du processus de consolidation. Cependant, elle remet en question le désengagement hippocampique (Figure 10). Initialement, Nadel et Moscovitch notent que la durée de l'amnésie rétrograde est très variable d'un cas à l'autre et que le degré de lésion de l'hippocampe pourrait expliquer ces disparités (Nadel et Moscovitch, 1997; Nadel *et al.*, 2000). Ils proposent une théorie alternative à la théorie standard, la théorie des traces multiples. Selon cette théorie, le phénomène de consolidation systémique ne résulte pas d'une « corticalisation » progressive de l'information, mais d'une **multiplication des traces lors de rappels.** Alors que la théorie standard de consolidation concerne globalement la mémoire déclarative, la théorie des traces multiples fait une distinction entre les mémoires sémantique et épisodique. Notamment, le fait que la mémoire épisodique ancienne soit moins susceptible de disparaitre, suite à une atteinte hippocampique, résulterait du rôle permanent de l'hippocampe dans la récupération de multiples souvenirs riches en détails contextuels. Plus l'hippocampe est lésé et plus le gradient d'amnésie est long, ne resteront que les souvenirs les plus anciens, c'est-à-dire ceux dont les traces se sont suffisamment « multipliées » pour

exister dans la partie de l'hippocampe préservée. La mémoire sémantique serait également tributaire de l'hippocampe, mais sur une période limitée et deviendrait, au cours du temps, dépendante du néocortex.



**Figure 10 : La théorie des traces multiples** (d'après Frankland et Bontempi, 2005). La théorie standard (à gauche) suppose un désengagement total de l'hippocampe (HPC) au cours de la consolidation. La théorie des traces multiples (à droite) tient compte des dissociations observées entre mémoire épisodique et sémantique. Elle suppose qu'il n'y ait aucun désengagement de l'hippocampe lors de la consolidation d'une mémoire épisodique.

Cette théorie diffère de la théorie classique car elle considère que l'hippocampe est, au même titre que le néocortex, toujours impliqué pour la formation, le stockage et la restitution d'une mémoire épisodique, quelle que soit son ancienneté (Maguire et Frith, 2003; Addis *et al.*, 2004). Elle permet de prédire les amnésies rétrogrades graduées sur la base de l'étendue et de la localisation de la lésion au sein de l'hippocampe (Moscovitch *et al.*, 2006). Elle présente également l'avantage de prendre en compte la dissociation épisodique/sémantique observée dans les cas cliniques lors de lésions temporales internes, la lésion bilatérale de l'hippocampe provoquant une amnésie des souvenirs épisodiques, mais n'affectant que relativement peu le rappel de connaissances sémantiques (Vargha-Khadem *et al.*, 1997; Gadian *et al.*, 2000).

La grande majorité des données étayant la théorie des traces multiples provient d'épreuves de discrimination spatiale, réalisées le plus souvent en piscine de Morris (Bolhuis *et al.*, 1994; Sutherland *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005b, a; Martin *et al.*, 2005) ou en

labyrinthe en croix (Winocur *et al.*, 2005) chez le rat. Dans ce cadre, il a été montré que l'inactivation temporaire de l'hippocampe (par injection de lidocaïne), quelques heures ou 30 jours après un apprentissage en piscine de Morris, perturbe à la fois les souvenirs récents et anciens (Broadbent *et al.*, 2006). Plus récemment, des travaux menés chez la souris ont montré l'implication de nouveaux neurones du gyrus denté dans la récupération de souvenirs anciens en piscine de Morris (Trouche *et al.*, 2009). Cependant, pour certains auteurs, l'épreuve classique de la piscine de Morris présente des caractéristiques particulières tenant au fait que l'animal doit intégrer continuellement des informations allocentriques et égocentriques pour l'intégration constante de sa position dans son environnement (Teixeira *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007).

## I.B.2. La consolidation cellulaire

En 1996, McGaugh formule l'hypothèse de la consolidation cellulaire correspondant au passage d'une mémoire à court terme à une mémoire plus stable (McGaugh, 1966, 2000; Bozon *et al.*, 2002; Bozon *et al.*, 2003). Il s'agit d'un mécanisme conservé au cours de l'évolution. D'une manière générale, la consolidation cellulaire se réfère plus particulièrement aux évènements moléculaires et cellulaires post-apprentissage à l'origine de modifications durables au sein du réseau neuronal sous-tendant la trace mnésique.

# a) <u>Mécanismes physiologiques de l'encodage de la mémoire : le</u> <u>modèle de la potentialisation à long terme (PLT)</u>

Donald Hebb propose, en 1949, la théorie de la *double trace* basée sur les capacités de plasticité neuronale (Hebb, 1949). Pour Hebb, « *la persistance ou la répétition d'une activité réverbérante (ou « trace ») tend à induire des changements cellulaires durables qui ajoutent à sa stabilité* ». Il émet son postulat définissant l'activité synaptique comme garante de la trace mnésique : «*Quand un axone de la cellule A est suffisamment proche pour exciter la cellule B de façon répétitive ou persistante, il se produit un processus de croissance ou un changement métabolique tel que l'efficacité de A, en tant que cellule excitant B s'en trouve augmentée.»*. Ce postulat correspond à ce que nous appelons communément la « **synapse de** 

**Hebb** », précurseur de notre conception actuelle des modifications d'activité synaptiques à l'origine de la consolidation cellulaire. La première illustration de ce mécanisme a été effectuée plus tardivement lors de la mise en évidence du phénomène de potentialisation à long terme (PLT).

Les premières évidences expérimentales de la PLT ont été décrites par Bliss et Lomo (Bliss et Lomo, 1973) dans l'hippocampe de lapin. Ces auteurs ont découvert que l'application, pendant quelques secondes, de stimulations électriques à haute fréquence (« stimulation tétanique »), délivrées au niveau de la voie perforante reliant le cortex entorhinal à l'hippocampe, augmente de manière rapide et durable l'efficacité de la transmission synaptique de cette voie. Par la suite, l'existence de la PLT fut confirmée au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe ainsi que dans d'autres structures cérébrales telles que l'amygdale ou le cortex préfrontal (Racine *et al.*, 1983; Voronin, 1984; Chapman *et al.*, 1990; Laroche *et al.*, 1990; Uno et Ozawa, 1991).

La PLT est divisée en deux étapes : la première étape, dite d'induction, dure 1-3 heures et requiert seulement la modification covalente de protéines préexistantes. La seconde étape « tardive » de stabilisation persiste plusieurs heures et nécessite la synthèse de nouveaux ARN et protéines (Bailey *et al.*, 1996; Kandel, 2001). Ainsi, la PLT présente des propriétés similaires à la synapse de Hebb et, de ce fait, est perçue comme un modèle valable pour étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de la mémoire (Teyler et Discenna, 1984; Lynch *et al.*, 2007).

L'induction de la PLT, au niveau de l'aire CA1, requiert l'activation des récepteurs NMDA (Collingridge *et al.*, 1983 ; Tsien *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 2000) puis une dépolarisation (Malinow et Miller, 1986) qui permet l'influx de calcium (Ca<sup>2+</sup>) dans les neurones post-synaptiques (Lynch *et al.*, 1983). Ces ions vont activer des cascades de signalisation impliquant différentes kinases, comme la calcium calmoduline Kinase II (CaMKII), la proteine kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA) (Pour revue, Peng *et al.*, 2011).

En ce qui concerne **la stabilisation de la PLT**, l'activation de la cascade des **MAPK/ERK1/2** (*Mitogen-activated protein kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinase*), en tant que « point de convergence » de diverses kinases, joue un rôle majeur dans la plasticité synaptique *in vitro* (English et Sweatt, 1996; Coogan *et al.*, 1999) et dans la PLT *in vivo* (McGahon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000). L'activation, puis la translocation nucléaire

des MAPK/ERK (Chen *et al.*, 1992) permet l'activation/phosphorylation de facteurs de transcription, tels que Elk-1 et **CREB** (*cAMP-response element binding*) et facilite ainsi la transcription d'une multitude de gènes (Davis *et al.*, 2000; Sweatt, 2001; Valjent *et al.*, 2001; Sananbenesi *et al.*, 2003). Ainsi, l'activation rapide et transitoire de gènes précoces, tels que *fos, c-jun* et *zif268*, agissant comme des « commutateurs moléculaires » pour réguler l'expression d'autres gènes effecteurs tardifs, permet la synthèse de nouvelles protéines qui contribuent au maintien de la phase tardive de la PLT (Otani et Abraham, 1989; Frey *et al.*, 1993). La régulation de ces nombreux gènes effecteurs s'effectue selon des vagues temporelles successives qui peuvent s'étaler sur plusieurs jours (Pour revue, Davis et Laroche, 1998). Suite à ces travaux, de nombreuses études ont tenté d'établir une relation entre les módifications observées durant l'induction ou la stabilisation de la PLT hippocampique et les mécanismes sous-jacents à la formation de mémoires dépendantes de l'hippocampe (Morris *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 2000).

### b) Mécanismes cellulaires et moléculaires de la consolidation

La consolidation d'une mémoire à court terme en une mémoire à long terme repose également sur des mécanismes de plasticité neuronale dépendant d'une synthèse protéique (McGaugh, 1966; Davis et Squire, 1984; McGaugh, 2000; Guzowski, 2002). Ces mécanismes de consolidation requièrent l'activation de cascades de kinases (PKA, PKC, CaMK, MEK, ERK) impliquant l'activation de seconds messagers. Ces kinases vont phosphoryler des facteurs de transcription (CREB, Elk-1) et permettre l'induction de gènes précoces (*fos, zif268*) et des vagues de synthèse d'ARNs et de protéines. Certaines de ces protéines produisent des changements structurels et fonctionnels dans les neurones et les synapses (Figure 11).

Parmi les kinases impliquées dans ces mécanismes, de nombreuses expériences montrent le rôle important de l'activation de la voie **AMPc/PKA**, dans le champ hippocampique CA1, pour la consolidation de la trace mnésique dans différentes tâches hippocampo-dépendantes (Pour revue, Abel et Nguyen, 2008). Par exemple, l'inhibition de la PKA hippocampique perturbe la consolidation mnésique dans une tâche d'évitement passif (Quevedo *et al.*, 1997; Vianna *et al.*, 1999) alors que son activation facilite la consolidation à long terme dans une procédure de conditionnement de peur au contexte (Barad *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 1999). Au laboratoire, l'importance fonctionnelle de cette voie a été montrée dans

la consolidation d'un apprentissage spatial en piscine de Morris ou en labyrinthe radiaire (Mons *et al.*, 1999; Mons *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2006). Il est important de noter que la fenêtre temporelle d'activation de la PKA hippocampique est un élément critique dans le stockage des informations à long terme. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de la PKA à des délais post-apprentissage précoces (0 min) et tardifs (3-6h) perturbe la consolidation de tâches d'évitement (Bernabeu *et al.*, 1997; Bourtchouladze *et al.*, 1998; Martel *et al.*, 2006).

La voie des **MAPK/ERK**, en tant que « point de convergence » de diverses kinases, est également une étape clé pour la consolidation de mémoires dépendantes de l'hippocampe, comme la mémoire spatiale en piscine de Morris (Blum *et al.*, 1999; Selcher *et al.*, 1999), le conditionnement contextuel (Atkins *et al.*, 1998; Schafe *et al.*, 1999; Sananbenesi *et al.*, 2002; Trifilieff *et al.*, 2006; Trifilieff *et al.*, 2007), l'aversion gustative conditionnée (Berman *et al.*, 1998) et la reconnaissance d'objet (Bozon *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2003).

D'une façon générale, l'activation des cascades de kinases concourt à la mise en place de la dynamique temporelle d'activation du facteur de transcription **CREB** et, en aval, à la régulation fine et coordonnée de la réponse génomique des neurones dans une structure donnée (Han *et al.*, 2007; Won et Silva, 2008). Sur le plan comportemental, l'activation de CREB hippocampique joue un rôle crucial dans la consolidation de mémoires spatiales (Mizuno *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2007; Porte *et al.*, 2008b). Par exemple, des souris mutantes dont le gène CREB est invalidé dans l'hippocampe présentent des déficits de mémoire spatiale en piscine de Morris (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Pittenger *et al.*, 2002). De la même manière, l'inactivation de la fonction CREB spécifiquement dans l'hippocampe, par l'injection d'oligonucléotides antisens, perturbe la mémoire à long terme mais n'affecte pas la mémoire à court terme (Guzowski et McGaugh, 1997; Florian *et al.*, 2006). A l'inverse, l'injection locale de vecteurs viraux induisant l'expression de CREB constitutivement actif dans les neurones hippocampiques facilite la PLT hippocampique (Marie *et al.*, 2005; Marchetti *et al.*, 2011).



**Figure 11 : Schéma simplifié des voies de signalisation impliquées dans la consolidation cellulaire** (adapté de Impey *et al.*, 1999). Ces voies (PKA, PKC, CaMK, MAPK) convergent vers la phosphorylation du facteur de transcription CREB, qui induit l'expression de gènes précoces puis tardifs. TyrK : récepteur Tyrosine Kinase, RAMPA : récepteur AMPA au glutamate, RNMDA : récepteur NMDA au glutamate, VGCC : canaux calciques voltages dépendants, RCPG : récepteur couplé à une protéine G, AC : Adénylate Cyclase, CaM : Calmoduline, RE : Réticulum Endoplasmique, PLC : Phospholipase C, PIP2 : Phosphatidyl Inositol diphosphate, DAG : Diacyl Glycérol, IP3 : Inositol triphosphate, CBP : CREB Binding Protein.

L'activation de la cascade ERK/CREB permet l'induction de **gènes précoces** puis tardifs qui sont responsables de la synthèse de **nouvelles protéines effectrices** (Kandel, 2001) participant à la stabilisation à long terme de la mémoire. L'implication de la voie ERK/CREB dans la consolidation de mémoires hippocampo-dépendantes a été démontrée dans différents types d'apprentissage comme le conditionnement de peur (Trifilieff *et al.*, 2006; Trifilieff *et al.*, 2007) et l'apprentissage spatial en piscine de Morris (Porte *et al.*, 2008b). Cependant, un

nombre croissant de travaux récents chez l'animal montrent que la formation de la mémoire est également modulée par des mécanismes épigénétiques incluant des changements de méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles par phosphorylation, acétylation ou méthylation des histones (Alarcon *et al.*, 2004; Korzus *et al.*, 2004; Levenson *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2005; Levenson et Sweatt, 2006).

Introduction générale - Les mémoires

# Partie II : Acétylation des histones et mémoires hippocampo-dépendantes

# II.A. L'épigénétique

# II.A.1. Définition de l'épigénétique

Le terme épigénétique, introduit en 1942 par Conrad Waddington, désigne les processus permettant aux gènes de contrôler le développement de l'organisme et son fonctionnement. Waddington souligne ainsi l'incapacité de la génétique Mendélienne à expliquer le développement embryonnaire. L'épigénétique est donc une nouvelle science capable de combler les insuffisances de la génétique. Elle représente une vision complémentaire du contrôle de l'information génétique et désigne la grande diversité des mécanismes modulant l'expression des gènes. Ainsi, l'épigénétique permet de relier l'inné et l'acquis.

Le deuxième sens du mot épigénétique, dominant aujourd'hui, désigne le **contrôle de** l'activité des gènes par méthylation de l'ADN ou **modifications de composants de la chromatine**, dont nous détaillerons la structure dans le paragraphe suivant. Il s'agit donc de l'ensemble des mécanismes qui permettent aux cellules de s'adapter aux différents événements de leur vie en modulant leur programme d'expression génétique (Bird, 2007). Les modifications de l'information épigénétique sont stables et modulables par de nombreux facteurs reflétant un état physiologique ou pathologique de la cellule. Il existe trois classes majeures d'information épigénétique : la méthylation de l'ADN, les ARNs non codants et les modifications post-traductionnelles des histones. Les travaux révélant que l'activité des gènes diffère en fonction de l'état de leur chromatine se multiplient dans les années 1960 et conduisent à la mise en évidence des premières modifications des histones (Allfrey *et al.*, 1964).

# II.A.2. Structure de la chromatine

L'ADN s'organise autour des protéines histones pour former une structure nucléoprotéique très compacte appelée chromatine. Malgré ce fort degré de compaction, l'ADN doit rester accessible aux machineries protéiques régulant la transcription des gènes, mais également pour les mécanismes de réplication ou de réparation.

L'unité élémentaire de la chromatine est **le nucléosome**, défini en 1984 par Richmond *et al.* (1984) (Figure 12). Chaque nucléosome comprend lui-même une particule cœur et une région internucléosomique qui relie les particules adjacentes. La particule cœur est composée de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère composé de deux hétérodimères d'**histones** H2A et H2B et de deux hétérodimères d'histones H3 et H4 (Luger *et al.*, 1997). La région internucléosomique est caractérisée par la présence de l'histone H1, qui stabilise l'enroulement de l'ADN sur le nucléosome. La structure du nucléosome est maintenue par de nombreuses liaisons entre histones/ADN et histones/histones (Khorasanizadeh, 2004). Les histones sont de petites protéines basiques (11 à 22 kDa) conservées au cours de l'évolution, qui contiennent un domaine hydrophobe composé de trois hélices  $\alpha$ , impliqué es dans la dimérisation de ces protéines. La présence de charges positives leur permet d'interagir avec le squelette phosphodiester de l'ADN, chargé négativement (Dutnall et Ramakrishnan, 1997; Luger *et al.*, 1997). Les extrémités C- et N-terminales des histones s'étendent de chaque côté du domaine hydrophobe et font saillie à la surface du nucléosome, ce qui leur confère une grande accessibilité.



**Figure 12 : Structure d'un nucléosome** (http://www.thomasenielsen.org/histone.jp g). Celui-ci est composé de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 se situe à la région internucléosomique.

L'histone H1 (histone de liaison), dont il existe de nombreux variants (Khochbin, 2001), permet aux nucléosomes de s'enrouler sur eux-mêmes pour former une hélice régulière de 30 nm, composée de six nucléosomes par tour, appelée fibre solénoïdale (McGhee et Felsenfeld, 1980). Cette fibre s'enroule en boucles d'ADN pour former l'**euchromatine**, qui constitue la forme peu condensée du chromosome. Elle est facilement accessible aux facteurs de transcription et donc associée à une **transcription active des gènes.** A l'inverse, la forme très condensée du chromosome, appelée hétérochromatine (Passarge, 1979), est localisée en périphérie du noyau et du nucléole et reste faiblement transcrite (Figure 13). Une réorganisation dynamique de l'hétérochromatine est donc nécessaire pour permettre l'accès aux machineries moléculaires de la transcription. Ainsi, les modifications post-traductionnnelles des histones, survenant majoritairement aux extrémités N-terminales de ces dernières, jouent un rôle clé dans la régulation de la dynamique de la structure chromatinienne et l'activité des gènes.



**Figure 13 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN** (d'après Grunstein, 1992). Les nucléosomes sont compactés entre eux par l'intermédiaire de l'histone H1 pour former la fibre solénoïdale. Le dernier niveau de compaction abouti à la formation du chromosome.

# II.A.3. Les histones et leurs modifications : le « code histone »

Comme nous venons de le mentionner, les queues N-terminales des histones H2A, H2B, H3 et H4 sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 14A) comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation. Comme indiqué dans le Tableau 1, la majeure partie de ces modifications apparait sur les résidus lysine. Dans la plupart des cas, ces modifications sont clairement associées à un état transcriptionnel activé ou réprimé.

Modifications	Enzymes impliquées	Résidus modifiés	Effet transcriptionnel
Acétylation des lysines	Histones acétyltransférases	H2A (5, 9, 13) H2B (5, 12, 15,	Activation
Déacétylation des lysines	Histones déacétylases	20) H3 (9, 14, 18, 23, 27) H4 (5, 8, 12, 16, 20)	Répression
Méthylation des arginines	Arginine méthyltransférase	H3 (2,26) H4 (3)	Activation
Méthylation des lysines	Histones méthyltransférases	H3 (4, 8, 9, 14, 23, 27, 36) H4 (12, 20)	Activation Répression
Déméthylation des arginines	Déiminases	H3 (2, 17, 26) H4 (3)	Répression
Déméthylation des lysines	Lysine déméthylases	H3 (4, 9, 27, 36) H4 (20)	Activation Répression
Phosphorylation des sérines	Protéines kinases	H2A (1) H2B (14) H3 (10, 28) H4 (1)	Activation
Phosphorylation des thréonines	Protéines kinases	H2A (120) H3 (3, 11, 22)	Activation
Ubiquitination des lysines	Cascade d'ubiquitination	H2A (119)	Activation Répression
Déubiquitination des lysines	Bmi/ring1A RNF20/RNF40	H2B (120)	Activation Répression
Sumoylation	Cascades de sumoylation	H2A (126) H2B (6,7)	Répression

Tableau 1 : Les différents types de modifications des histones.

Les modifications post-traductionnelles des histones les plus étudiées pour leur implication dans les processus de plasticité synaptique et de mémorisation sont l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation.

L'acétylation est réversible et s'effectue exclusivement sur des résidus lysine. L'acétylation des lysines 9 et 14 de H3 et des résidus lysines 8 et 16 de H4 sont fortement associées à l'activation de la transcription (Berger, 2007). L'acétylation neutralise la charge positive de la lysine et provoque des changements d'affinité entre l'ADN et les histones. D'autre part, elle permet l'ancrage de protéines régulatrices établissant ou stabilisant l'euchromatine (de la Cruz *et al.*, 2005). Ces changements aboutissent à une chromatine plus flexible, dans laquelle l'ADN est plus accessible et donc transcriptionnellement actif.

La phosphorylation survient sur les résidus sérine et thréonine. Elle est globalement associée à une transcription active (Berger, 2007).

La méthylation a lieu sur des résidus lysines ou arginines. Plusieurs groupements méthyl peuvent être ajoutés à un même résidu, il existe ainsi des lysines mono-, di- ou triméthylées. Les effets sur la transcription varient en fonction du résidu modifié ou du contexte. Par exemple, la méthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27 et de H4 sur la lysine 20 sont corrélées à une répression transcriptionnelle alors que la triméthylation de H3 sur la lysine 4 active la transcription (Berger, 2007).

Ces modifications post-traductionnelles interviennent de manière séquentielle ou en combinaison, pour former le « **code histone** » (Figure 14B). Ce code complexe permet d'associer chaque combinaison de modification d'histones à un état particulier de la chromatine (Jenuwein et Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Ceci permet de contrôler les modifications cellulaires liées à l'ADN, telles que la transcription de gènes, en réponse à des changements physiologiques dans la cellule (Strahl et Allis, 2000; Jenuwein et Allis, 2001; Fischle *et al.*, 2003). De plus, le fait que la méthylation d'un même résidu lysine puisse être multiple (1 à 3 groupements sur un même résidu) ajoute un degré de complexité supplémentaire et augmente la diversité des fonctions biologiques pouvant être induites par un remodelage de la chromatine (Bannister et Kouzarides, 2005).

Les modifications d'un même résidu peuvent entrer en compétition (Yang, 2005) ou entrainer d'autres modifications sur la même histone. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 facilite l'acétylation de sa lysine 14 (Cheung *et al.*, 2000; Clements *et al.*, 2003), cette double modification étant la marque d'une transcription active (Fischle *et al.*, 2003). La méthylation (et préférentiellement la diméthylation) de H3 sur la lysine 4

permet, quant à elle, l'acétylation de cette même histone sur la lysine 14 (Wu *et al.*, 2011). Au contraire, les modifications des histones sur différents résidus peuvent s'inhiber mutuellement (Eissenberg et Elgin, 2005), comme la méthylation de la lysine 9 de H3 et la phosphorylation de son résidu voisin (sérine 10, Fischle *et al.*, 2005). Enfin, il existe des interactions entre modifications de résidus de 2 histones différentes. En effet, l'ubiquitination de H2B est nécessaire à la méthylation de H3 sur son résidu lysine 4 (Lee *et al.*, 2007; Suganuma et Workman, 2008; Cao et Yan, 2012; Racine *et al.*, 2012).

Une description détaillée du rôle de chaque modification d'histone dans la plasticité synaptique et la formation de la mémoire est hors du cadre de cette thèse. C'est pourquoi seul le cas particulier de l'acétylation des histones sera exposé dans la section suivante.



**Figure 14 : Interdépendance des modifications post-traductionnelles des histones** (d'après Graff et Mansuy, 2008). (A) Représentation des modifications intervenant sur chaque résidu des histones composant le nucléosome. (B) Exemple d'interdépendance des modifications sur la terminaison N-terminale de l'histone H3. S : Sérine, K : Lysine, T : Thréonine, R : Arginine.

# II.B. Rôle de l'acétylation des histones dans la plasticité synaptique et les mémoires hippocampo-dépendantes

L'acétylation des histones, en permettant à la chromatine de se décompacter, contribue à l'induction de gènes précoces impliqués dans la plasticité neuronale et la consolidation de la mémoire à long terme (Graff et Mansuy, 2008). De plus, une dérégulation de la balance acétylation/déactéylation des histones est impliquée dans un grand nombre de pathologies cognitives et psychiatriques telles que le syndrome de Rubinstein-Taybi, les maladies d'Alzheimer et de Huntington, la schizophrénie ou encore l'addiction (Graff et Mansuy, 2008; Renthal et Nestler, 2009).

# II.B.1. Acétylation des histones et plasticité synaptique

Les premières études sur l'implication de l'acétylation des histones dans les processus de plasticité et de mémoire ont été effectuées chez le mollusque marin *Aplysia* (Aplysie) (Guan *et al.*, 2002). Cet animal possède un réflexe de retrait du siphon par stimulation tactile, pouvant être potentialisé par application d'un stimulus électrique au niveau de la queue, concomitante à la stimulation tactile. Ce phénomène, appelé facilitation à long terme nécessite l'activation des récepteurs sérotoninergiques, de kinases (PKA, PKC) et de facteurs de transcription tels que CREB. Le traitement à la sérotonine de cellules en culture entraine le recrutement de CBP (*CREB Binding protein*, possédant une activité acétyltransférase), ainsi que **l'acétylation des histones H3 et H4** au promoteur du gène *C/EBP* nécessaire à la facilitation à long terme (Alberini *et al.*, 1994). De plus, l'acétylation de ces histones est augmentée au niveau du promoteur de *ap-uch (ubiquitin C-terminal hydroxylase)*, un gène également impliqué dans la facilitation à long terme (Hegde *et al.*, 1997), en réponse à un traitement au tétrapeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFa, Fioravante *et al.*, 2008).

Chez le rat, le traitement d'une culture de neurones hippocampiques au NMDA ou l'activation des voies PKA (par la forskoline) et PKC (par le phorbol ester) conduit à l'augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H3, *via* l'activation de la voie des MAPK/ERK (Levenson *et al.*, 2004; Chwang *et al.*, 2006). Ces traitements sont inefficaces chez des souris *Knock-Out* pour le gène *msk1 (mitogen- and stress-activated kinase)*, codant pour une kinase en aval de ERK (Chwang *et al.*, 2007). En effet, l'activation de MSK1

contribue à la phosphorylation de H3 sur la sérine 10 et également à l'acétylation de H3 sur sa lysine 14, dans l'hippocampe, confirmant ainsi l'implication de ERK dans la régulation de H3 (Soloaga *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été démontré que, lors d'une dépolarisation induite par une forte concentration de chlorure de potassium dans l'hippocampe, l'acétylation de l'histone H2B dépendait également de l'activation de ERK (Maharana *et al.*, 2010). D'une manière générale, la cascade **MAPK/ERK** semble agir comme un nœud moléculaire (Reissner *et al.*, 2006) régulant la plasticité synaptique et la mémoire en agissant à la fois sur les facteurs de transcription, l'acétylation des histones et la synthèse protéique.

Une stimulation pharmacologique de nombreux récepteurs, incluant ceux à la dopamine et à l'acétylcholine, sur des tranches d'hippocampe de souris, conduit également à l'augmentation du taux de **H3** à la fois phosphorylée sur sa sérine 10 et acétylée sur sa lysine 14 (Crosio *et al.*, 2003). Enfin, des données récentes démontrent qu'un traitement au BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) de tranches d'hippocampe de rat augmente la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs dans cette structure cérébrale, tout en induisant l'acétylation de H3 sur ses lysines 9 et 14 (Calfa *et al.*, 2011).

# II.B.2. Implication de l'acétylation des histones dans les processus de mémorisation

De nombreuses études ont examiné la contribution potentielle de l'acétylation des histones dans différentes formes d'apprentissages associatifs chez des espèces différentes (Tableau 2, Pour revues, Nelson et Monteggia, 2011; Puckett et Lubin, 2011; Sultan et Day, 2011). En utilisant différentes tâches hippocampo-dépendantes, telles que le conditionnement de peur, la reconnaissance d'objet ou une épreuve spatiale en piscine de Morris, des travaux ont clairement établi que les profils d'acétylation des histones varient en fonction du type de tâche et du degré d'implication de l'hippocampe dans la tâche à consolider (Pour revue, Peixoto et Abel, 2012).

La première publication montrant l'implication différentielle des histones H3 et H4 acétylées en fonction de la nature de la tâche est basée sur l'utilisation de deux versions d'un **conditionnement aversif** chez le rat (Levenson *et al.*, 2004). Cette étude rapporte qu'un conditionnement de peur dépendant du contexte augmente le niveau d'acétylation de H3 sur sa lysine 14, mais pas celui de l'histone H4, spécifiquement dans la région CA1 de l'hippocampe. Cependant, lors d'une procédure d'inhibition latente durant laquelle les

animaux sont pré-exposés au contexte de conditionnement, une augmentation de l'acétylation de H4, mais pas de H3, est observée dans la région CA1. Dans ce paradigme, les animaux mettent en place une mémoire de type spatial qui empêche l'association entre le choc électrique et le contexte (Lubow, 1973). Dans les deux cas, l'augmentation d'acétylation des histones H3 et H4 est précoce (une heure après le conditionnement) et le niveau d'acétylation revient au niveau basal 24h après le conditionnement. Une augmentation de l'acétylation de H3 dans l'hippocampe a également été constatée dans deux autres études utilisant cette même procédure (Chwang *et al.*, 2006; Chwang *et al.*, 2007). Cependant, contrairement aux travaux précédents, une étude de Peleg *et al.* (2010) effectuée chez la souris indique qu'un conditionnement de peur au contexte induit non seulement une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sur ses résidus lysine 9 et 14, mais également de l'histone H4 sur ses lysines 5, 8 et 12. De plus, cette même étude montre clairement que la diminution de l'acétylation de l'histone H4 sur sa lysine 12 dans l'hippocampe est responsable des perturbations mnésiques associées au vieillissement.

Plus récemment, une étude utilisant le paradigme de la **piscine de Morris** démontre que l'entrainement dans les versions spatiale et non-spatiale de ce test s'accompagne de profils différents d'acétylation des histones H2B, H3 et H4 dans l'hippocampe dorsal de rats (Bousiges *et al.*, 2010). Ainsi, des rats consolidant la trace mnésique associée à la localisation de la plateforme immergée (apprentissage spatial, requérant l'intégrité de l'hippocampe) présentent une augmentation spécifique de l'acétylation des histones H2B et H4, dans l'hippocampe par rapport à des rats nageant vers une plateforme visible (donc n'apprenant pas la tâche spatiale). L'acétylation de H3 est, quant à elle, induite suite aux deux types d'apprentissage. Cette étude montre également que l'acétylation des histones H2B et H4 est augmentée aux promoteurs des gènes *fos* et *zif268* et perturbée chez des rats présentant une dénervation de l'hippocampe ainsi que de graves déficits de mémoire spatiale. Selon ces auteurs, l'acétylation des histones H2B et H4 hippocampiques pourrait représenter un marqueur épigénétique spécifique d'une mémoire à long terme pour l'information spatiale alors que l'acétylation de H3 serait davantage réactive au contexte environnemental plutôt qu'au test spatial en lui-même.

L'ensemble de ces données révèle une augmentation spécifique de l'acétylation de certains résidus d'histones dans les structures cérébrales sous-tendant les types de mémoire mis en jeu. Notamment, la mise en place des mémoires spatiale ou contextuelle, hippocampodépendantes, semble clairement dépendre de la régulation dynamique de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 dans l'hippocampe dorsal. Cependant, les résidus des différentes histones n'étant pas acétylées et déacétylées par les mêmes enzymes et ne recrutant pas les mêmes complexes protéiques (Suganuma et Workman, 2011), différents types d'apprentissages pourraient conduire à diverses combinaisons d'acétylation des histones et à l'établissement de programmes transcriptionnels spécifiques dans les structures cérébrales sous-tendant les différents types de mémoire.

# II.C. Rôle particulier des histones acétyltransférases et histones déacétylases

L'acétylation des histones est contrôlée par les activités conjointes et indissociables des histones acétyltransférases (HATs) et des histones déacétylases (HDACs) (Figure 15, Vogelauer *et al.*, 2000; Eberharter et Becker, 2002; Yang et Seto, 2007). Cette balance entre les deux processus peut être artificiellement perturbée, en faveur d'une augmentation de l'acétylation, par l'administration d'agents pharmacologiques, les inhibiteurs des HDACs (IHDACs).



**Figure 15 : Contrôle du niveau d'acétylation des histones par les histones acétyltransférases et histones déacétylases.** Les histones acétyltransférases acétylent les histones sur leurs résidus lysine (K), ce qui est associé à une transcription active. La réaction inverse implique les histones déacétylases et conduit à la répression de la transcription.

# II.C.1. Les histones acétyltransférases

Les HATs possèdent deux fonctions : une activité enzymatique acétyltransférase et la capacité à former des complexes multi-protéiques en recrutant différents éléments de la machinerie transcriptionnelle. Elles sont responsables du transfert d'un résidu acétyl depuis le cofacteur acétylcoenzyme A vers les groupements ɛ-amines des résidus lysine des histones (Hodawadekar et Marmorstein, 2007). Elles peuvent également acétyler des protéines non-histones, notamment des facteurs de transcription (Glozak *et al.*, 2005; Yang et Seto, 2007).

Les HATs sont réparties en six familles selon leurs homologies de séquence (Sterner et Berger, 2000). Nous nous intéresserons principalement à la famille p300/CBP dont les deux membres sont impliqués dans de nombreuses fonctions telles que l'apoptose, la différentiation et le contrôle du cycle cellulaire (Giordano et Avantaggiati, 1999; Goodman et Smolik, 2000). Ils sont souvent associés l'un à l'autre mais possèdent cependant, dans certains cas, des fonctions distinctes (Kalkhoven, 2004).

#### a) <u>Régulation de l'activité de CBP</u>

CBP présente une fonction HAT et une fonction co-activatrice de la transcription, qui interviennent toutes les deux dans l'activation de la transcription (Korzus et al., 1998; Martinez-Balbas et al., 1998). Elle ne se lie pas directement à l'ADN mais est recrutée au niveau de promoteurs spécifiques grâce à son interaction avec des facteurs de transcription, notamment CREB, qui se lient à l'ADN. En effet, CBP possède un domaine KIX, qui lui permet d'interagir avec CREB ou Jun, ainsi qu'un domaine de liaison à p53, Fos ou PCAF (p300/CBP associated factor). L'activité HAT de CBP permet l'acétylation des lysines présentes aux extrémités N-terminales des quatre histones du nucléosome (H2A, H2B, H3 et H4). Elle est régulée par la PKA, qui permet sa liaison avec CREB (Chrivia et al., 1993) ou encore par la voie des MAPK, ce qui aboutit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du facteur Elk-1 (Janknecht et Nordheim, 1996). CBP est également phosphorylée par la Phosphoinositide-3-kinase (Zanger et al., 2001) ou la CaMKIV qui, en agissant sur sa sérine 301, augmente sa fonction de co-activateur de la transcription mais pas son activité HAT (Impey et al., 2002). Par ailleurs, la méthylation de CBP par CRAM1 (Coactivator Associated Methyltransferase 1) sur ses deux résidus arginine bloque le recrutement de CBP par CREB phosphorylé (Xu et al., 2001).

## b) CBP et mémoires hippocampo-dépendantes

Des études récentes, basées sur l'utilisation de différentes souris présentant une inactivation du gène cbp, ont montré le rôle crucial joué par l'activité HAT de CBP dans la PLT et la formation de la mémoire à long terme chez les rongeurs, notamment celle de mémoires hippocampo-dépendantes. En premier lieu, les souris cbp+/-, ne possédant qu'un allèle de CBP, présentent une diminution de l'acétylation de H2B associée à une altération de la phase tardive de la PLT dans l'hippocampe (Alarcon et al., 2004) et des déficits de mémoire à long terme dans des tâches de reconnaissance d'objet et de conditionnement de peur au contexte (Bourtchouladze et al., 2003; Alarcon et al., 2004). De plus, chez ces mêmes souris, l'exposition à un milieu enrichi n'induit ni neurogénèse, ni amélioration des capacités mnésiques, comme ce qui est observé chez des souris sauvages (Lopez-Atalaya et al., 2011). D'autres souris, dont la fonction HAT ou le domaine KIX de CBP (permettant son recrutement par des facteurs de transcription, tels que CREB) sont supprimées, présentent également des déficits spécifiques de fonctions mnésiques sollicitant l'hippocampe (mémoire à long terme testée en reconnaissance d'objet, conditionnement de peur au contexte ou mémoire spatiale en piscine de Morris) tandis que d'autres fonctions sont préservées (mémoire à court terme, mémoire procédurale, Korzus et al., 2004 ; Wood et al., 2005; Wood et al., 2006; Stefanko et al., 2009).

Plus récemment, des souris *Knock-Out* conditionnelles, permettant d'inactiver le gène *cbp* spécifiquement dans certaines régions du cerveau ont été développées. Le retrait de CBP dans les neurones principaux du prosencéphale entraine une perturbation modérée de la mémoire à long terme en reconnaissance d'objet, alors que les performances dans les versions indicée et spatiale d'une épreuve en piscine de Morris ou encore en conditionnement de peur au contexte restent inchangées (Valor *et al.*, 2011). Ces perturbations s'accompagnent d'une diminution de l'acétylation des histones H2A et H2B. Cependant, lorsque la mutation concerne tous les neurones du cortex et de l'hippocampe, les souris présentent des déficits d'acquisition et de rétention à court et long terme dans différentes tâches faisant intervenir l'hippocampe, par exemple lors d'un apprentissage spatial en piscine de Morris (Chen *et al.*, 2010). Enfin, lorsque la mutation conditionnelle de *cbp* se restreint aux **neurones de la région CA1 hippocampique**, une altération de la PLT et une diminution des performances à long terme en reconnaissance de localisation d'objet ou en conditionnement de peur au contexte sont observés, sans altération majeure de la mémoire à court terme (Barrett *et al.*, 2011). En revanche, les souris ne présentent aucun déficit en reconnaissance d'objet classique,

qui fait intervenir les régions annexes à l'hippocampe (cortex périrhinal et insulaire) mais ne sollicite pas l'hippocampe proprement dit (Balderas *et al.*, 2008). Enfin, un lien causal a également été établi entre l'hypoacétylation résultant de la perte d'activité HAT de CBP et l'altération de la transcription de gènes dans des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, l'atrophie musculaire spinale ou la maladie de Huntington (Saura *et al.*, 2004; Francis *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2007; Graff et Mansuy, 2008).

### c) p300 et mémoires hippocampo-dépendantes

Même si la majeure partie des études étudiant l'implication des histones acétyltransférases dans les processus de mémorisation concerne CBP, il existe quelques données rapportant l'implication de p300 dans la formation de mémoires dépendantes de l'hippocampe. Des souris transgéniques conditionnelles exprimant une forme tronquée inhibitrice de p300 présentent une hypoacétylation de H3 dans le prosencéphale, associée à des déficits de mémoire à long terme lors de tâches de reconnaissance d'objet ou de conditionnement de peur dépendant du contexte (Oliveira *et al.*, 2007). Leur mémoire à court terme ainsi que leur réponse de peur évaluée 24h après un conditionnement aversif au son restent néanmoins préservées.

# II.C.2. Les histones déacétylases (HDACs) et leurs inhibiteurs (IHDACs)

## a) **Classifications des HDACs et IHDACs**

• Les HDACs

Les HDACs permettent de contrebalancer l'effet des HATs en retirant le groupe acétyl présent sur les lysines, restaurant ainsi leur charge positive (Forsberg et Bresnick, 2001). Il existe deux classifications des dix-huit HDACs connues à ce jour. La première, basée sur leur degré d'homologie avec leurs équivalents chez la levure, permet de les diviser en quatre classes. La seconde les regroupe en deux familles, selon leur dépendance à certains cofacteurs (Grozinger et Schreiber, 2002; Yang et Seto, 2007) : la famille classique, qui regroupe les classes I, II et IV et requiert l'ion Zn<sup>2+</sup> comme cofacteur (Figure 16) et la famille des sirtuines 1 à 7, qui correspond à la classe III et dépend de l'ion NAD+.



**Figure 16 : Classification des HDACs Zn<sup>2+</sup>-dépendantes** (adapté de Ruijter *et al.*, 2003). Les membres de la classe I (rouge) présentent des homologies de séquences avec l'HDAC de levure Rpd3 alors que la classe II (bleu) est plus proche de la protéine Hda1 de levure. HDAC11 (noir) constitue une classe à part entière car elle présente peu d'homologies de séquence avec les deux autres classes.

Les HDACs 1, 2, 3 et 8 de la **classe I** sont des homologues du répresseur transcriptionnel Rpd3 de levure (Morrison *et al.*, 2007). Elles sont exprimées de manière ubiquitaire et sont majoritairement présentes dans le noyau, excepté HDAC3, capable de se déplacer vers le cytoplasme (de Ruijter *et al.*, 2003; Dokmanovic et Marks, 2005).

Les HDACs de la **classe II** (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10) sont homologues de Hda1 de levure. Leur expression tissulaire est variable. Elles peuvent se déplacer du noyau vers le cytoplasme et *vice-versa* en réponse aux signaux cellulaires (de Ruijter *et al.*, 2003; Thiagalingam *et al.*, 2003; Morrison *et al.*, 2007).

La classe III, composée des membres de la famille des sirtuines, est apparentée à Sir2 de levure (Thiagalingam *et al.*, 2003).

La classe IV, composée uniquement de HDAC11, présente une forte homologie avec Rpd3 et possède des caractéristiques à la fois des HDACs de classe I et II (Gao *et al.*, 2002).

Dans le cerveau, les HDACs de la classe I et les HDACs 4, 5 et 11 sont fortement exprimées tandis que les autres ne sont quasiment pas représentées (Broide *et al.*, 2007).

### • Les inhibiteurs d'HDACs (IHDACs)

Les IHDACs sont de précieux outils pharmacologiques pour appréhender l'implication des mécanismes d'acétylation/déacétylation des histones dans de nombreuses fonctions et pathologies. Ils sont classiquement répartis en quatre classes (Marks *et al.*, 2004) :

- Les acides hydroxamiques les plus connus sont la Trichostatine A (TSA) et l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA ou Vorinostat). D'origine naturelle, la TSA cible les HDACs de classes I, II. Elle constitue actuellement un des outils principaux de la recherche sur l'implication de l'acétylation des histones dans les mécanismes de la consolidation mnésique (Dokmanovic et Marks, 2005; Fischer *et al.*, 2010).
- Les **acides aliphatiques**, comme le valproate de sodium ou le sodium butyrate ciblent les classes I et II d'HDACs (Dokmanovic et Marks, 2005).
- La classe des peptides cycliques ciblent les HDACs 1 et 2 (Xu et al., 2007).
- Les **benzamides**, dont le MS-275 inhibent principalement HDAC1 mais également HDAC2 et 3 (Hu *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2010).

La plupart des inhibiteurs touchant une large gamme d'HDACs, il est difficile de comprendre le rôle individuel de chaque HDAC dans la mémoire. C'est pourquoi de plus en plus d'études tendent à développer des molécules présentant une spécificité pour une HDAC particulière. Ainsi, la tubacine et le WT-161 ciblent sélectivement HDAC6 (Haggarty *et al.*, 2003) alors que le PCI-34051 est spécifique de HDAC8 (Balasubramanian *et al.*, 2008). Ces trois molécules appartiennent à la classe des acides hydroxamiques. Le RGFP136, composé de la famille des diphénylamide piméliques, cible, quand à lui, spécifiquement HDAC3 (Rai *et al.*, 2010; McQuown *et al.*, 2011).

De manière surprenante, l'inhibition des HDACs affecte la transcription d'un pourcentage restreint de gènes (jusqu'à 20 %) qui peuvent être réprimés ou activés et ce, en fonction de la nature du gène (Vecsey *et al.*, 2007). Par exemple, dans le cas où l'induction du gène nécessite une hyperacétylation stable, la transcription du gène est activée par les IHDACs. En revanche, lorsque l'induction des gènes comme *fos* ou *jun* requiert un turn-over rapide, les IHDACs répriment la transcription (Hazzalin et Mahadevan, 2005; Clayton *et al.*, 2006).

## b) HDACs et mémoires hippocampo-dépendantes

Le rôle individuel de chaque HDAC dans la formation de la mémoire à long terme est encore peu connu. Très récemment, Guan et al. (2009) ont utilisé des souris Knock-Out ou surexprimant les gènes codant pour HDAC1 et HDAC2 pour démontrer l'importance de HDAC2 dans la régulation de la plasticité synaptique et la consolidation des mémoires hippocampo-dépendantes chez la souris. La surexpression de hdac2, mais pas celle hdac1, induit des déficits de conditionnement de peur au contexte et de mémoire spatiale en piscine de Morris (Guan et al., 2009), tandis que la délétion du gène hdac2 améliore les performances mnésiques. Cette étude montre également que l'administration chronique de SAHA améliore la rétention à long terme du conditionnement au contexte chez des souris témoins, mais pas chez des souris invalidées pour le gène hdac2. De plus, l'injection d'un autre IHDACs, le WT-161, spécifique de HDAC6, n'influe pas sur les performances des souris surexprimant hdac2. Les auteurs concluent que HDAC2 pourrait réguler de façon négative la formation de la mémoire. Cependant, ils n'excluent pas un rôle de HDAC1 dans les processus de mémorisation à long terme. En effet, les auteurs montrent que la surexpression de hdac1 produit des effets comparables à ceux observés chez les souris Knock-Out pour hdac2 sur l'acétylation de H3 et de H4 aux promoteurs de différents gènes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. Par exemple, l'acétylation de H3 au promoteur de creb et celle de H4 au promoteur de fos sont augmentées dans les deux cas, ce qui pourrait refléter la mise en place d'un possible mécanisme compensatoire, la surexpression de HDAC1 pouvant induire la diminution d'expression de HDAC2.

Par ailleurs, HDAC1 semble spécifiquement impliquée dans la mise en place du processus d'extinction de la peur conditionnée, mais pas dans la phase de consolidation du conditionnement (Bahari-Javan *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, l'activité HDAC1 bloquerait l'acétylation de H3 sur sa lysine 9 au promoteur du gène *fos* et induirait la tri-méthylation de ce même résidu, avec pour conséquence la répression transcriptionnelle de *fos* (Bahari-Javan *et al.*, 2012). D'autres travaux récents ont également montré que **HDAC3 et HDAC4** ont, respectivement, un impact négatif et positif sur la formation de mémoires hippocampodépendantes à long terme (McQuown *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012)

### c) IHDACs et mémoires hippocampo-dépendantes

Si les IHDACs offrent de grandes perspectives dans les traitements anti-cancéreux (Marks *et al.*, 2004), un nombre croissant de travaux repose également sur leur utilisation pour comprendre le rôle de l'acétylation des histones dans le contrôle de l'expression des gènes nécessaires à la plasticité et à la mémoire (Tableau 2). Ainsi, l'administration d'IHDACs, comme la TSA ou le sodium butyrate, favorise la facilitation à long terme chez l'Aplysie (Guan *et al.*, 2002) et augmente l'induction de la PLT chez le rongeur (Alarcon *et al.*, 2004; Levenson *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004; Vecsey *et al.*, 2007). D'autres études utilisant des traitements systémiques ou intra-hippocampiques ont démontré les effets promnésiants des IHDACs sur des tâches d'apprentissage et de mémorisation dépendantes de l'hippocampe.

#### • Administration systémique d'IHDACs

Chez le rongeur, l'administration systémique, aigüe ou chronique, de sodium butyrate ou de TSA favorise l'établissement de la mémoire à long terme de peur conditionnée au contexte (Levenson *et al.*, 2004; Chwang *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2007), de la mémoire spatiale en piscine de Morris (Fischer *et al.*, 2007) et de la reconnaissance d'objet (Fontan-Lozano *et al.*, 2008). Très récemment, un nouvel IHDACs, le Crebinostat, ciblant les HDACs de classe I et HDAC6, a été identifié (Fass *et al.*, 2012). Son administration systémique et chronique, avant un conditionnement de peur, augmente la réponse de peur au contexte chez la souris et module l'expression de gènes impliqués dans les pathologies cognitives, notamment le *bdnf* (Fass *et al.*, 2012).

Il existe peu d'études sur les conséquences d'une injection aigüe d'IHDACs, sur la phase de consolidation mnésique proprement dite. Chez la souris, l'injection systémique de sodium butyrate immédiatement après l'apprentissage améliore la mémoire à long terme sans affecter la mémoire à court terme en reconnaissance d'objet (testée à 90 min, Stefanko *et al.*, 2009; Haettig *et al.*, 2011). En accord avec un rôle permissif de l'acétylation des histones durant la phase précoce de consolidation, l'injection systémique d'IHDACs possède un gradient temporel d'efficacité qui se situe dans les premières heures post-acquisition. En effet, l'injection systémique de sodium butyrate améliore la mémoire de rats âgés en reconnaissance d'objet lorsque celle-ci survient immédiatement après l'apprentissage, mais n'a pas d'effet lorsqu'elle est différée à 6h post-apprentissage (Reolon *et al.*, 2011).

#### • Administration intra-hippocampique d'IHDACs

Les études énoncées ci-dessus utilisent des traitements par voie systémique, souvent chroniques, et ne permettent donc pas de déterminer un lien direct entre l'augmentation de l'acétylation des histones hippocampiques et l'amélioration des capacités mnésiques. Il existe peu d'études utilisant une approche pharmacologique ciblant spécifiquement l'hippocampe pour évaluer les effets des IHDACs sur la phase de consolidation mnésique proprement dite. Chez des souris jeunes, l'administration intra-hippocampique de TSA immédiatement après un conditionnement contextuel induit une hyperacétylation de H3 sur sa lysine 14, survenant entre 1 et 4h après l'injection, dans la région CA1 de l'hippocampe et potentialise la réponse de peur au contexte à long terme. En revanche, la TSA ne modifie pas la réponse au son, dépendante de l'amygdale, lors du conditionnement élémentaire (Vecsey et al., 2007). De façon similaire, l'injection intra-hippocampique de TSA ou de MS-275 facilite la mémoire à long terme dans une tâche de reconnaissance de localisation d'objet (Hawk et al., 2011). Par ailleurs, l'utilisation du même paradigme expérimental a permis de montrer une dissociation entre les effets d'une injection post-apprentissage de sodium butyrate dans l'hippocampe ou dans le cortex insulaire (Roozendaal et al., 2010). En effet, alors que l'administration intrahippocampique de sodium butyrate améliore la reconnaissance de localisation d'objet, son injection dans le cortex insulaire favorise la capacité à discriminer simplement entre un nouvel objet et un objet familier.

Cependant, d'autres études ont rapporté des résultats contradictoires concernant l'effet facilitateur de l'administration d'IHDACs sur les performances mnésiques. D'une part, l'administration chronique et systémique de sodium butyrate ou de valproate de sodium, chez des souris sauvages de 4 mois, augmente les niveaux d'acétylation des histones mais n'a pas d'effet sur la réponse de peur au contexte (Kilgore *et al.*, 2010). D'autre part, Reolon *et al.* (2011) montrent que l'injection intra-péritonéale post-apprentissage de sodium butyrate chez le rat jeune n'améliore pas la rétention en reconnaissance d'objet testée 24h après l'apprentissage. Les auteurs proposent que, lorsque l'apprentissage conduit à une rétention optimale des événements acquis, l'administration d'IHADCs ne permette pas d'améliorer davantage les performances mnésiques. En outre, un certain nombre d'études réalisées avec des souris transgéniques soulignent également la nécessité de l'interaction entre CREB et CBP pour l'effet bénéfique des IHDACs sur la mémoire hippocampo-dépendante.

# • Rôle clé de CREB et CBP dans les effets bénéfiques des IHDACs sur la mémoire hippocampo-dépendante

Les expériences de Chwang et al. (2007) démontrent que l'administration systémique de sodium butyrate, avant l'apprentissage, facilite le conditionnement contextuel chez des souris sauvages, mais n'a pas d'effet sur les performances des souris Knock-Out pour mskl, une kinase en aval de ERK, qui phosphoryle l'histone H3 et CREB. De plus, chez des souris mutantes pour CREB, l'injection intra-hippocampique de TSA post-apprentissage n'améliore pas la PLT et ne potentialise pas la réponse de peur au contexte testée 24h après un conditionnement (Vecsey et al., 2007). En outre, l'utilisation de souris mutantes pour CBP a permis de montrer que cette HAT est capitale pour l'effet bénéfique des IHDACs sur la mémoire et la plasticité synaptique. D'une part, la réponse de peur au contexte n'est pas potentialisée par l'injection systémique et chronique de TSA chez les souris knock-Out conditionnelles présentant une perte de CBP dans tous neurones du cortex et de l'hippocampe (Chen et al., 2010). D'autre part, l'administration d'IHDACs n'influe pas sur les processus de plasticité de souris présentant une délétion du domaine d'interaction entre CREB et CBP (Vecsey et al., 2007). D'autres études confirment, chez ces mêmes souris, que l'injection post-apprentissage d'IHDACs ne permet pas de rétablir la mémoire à long terme en reconnaissance de la localisation d'objet, mais améliore la mémoire à long terme en reconnaissance d'objet classique (Haettig et al., 2011; McQuown et al., 2011). Barrett et al.

(2011) démontrent, quant à eux que, chez des souris dont la **fonction CBP est invalidée** spécifiquement dans le CA1 hippocampique, l'injection post-apprentissage de sodium butyrate n'induit pas l'hyperacétylation des histones H2B, H3 et H4 et n'a pas d'effet sur la plasticité synaptique et la mémoire à long terme dans différentes tâches hippocampodépendantes (reconnaissance de localisation d'objet et conditionnement contextuel). Ainsi, l'augmentation du niveau d'acétylation par injection d'IHDACs ne permet pas d'améliorer les mémoires hippocampo-dépendantes si l'interaction entre CREB/ CBP n'est pas fonctionnelle.

Paradigme comportemental	Principaux résultats	Auteurs
Conditionnement de peur au contexte	Augmentation de Ac-H3K14	Levenson <i>et al.,</i> 2004
	Implication de la voie MAPK/ERK/MSK1	Chwang <i>et al.</i> , 2006
	Le NaB améliore la mémoire contextuelle	Chwang <i>et al.,</i> 2007
	Comme l'exposition à un milieu enrichi, le NaB augmente Ac-H3 et Ac-H4 et la mémoire contextuelle	Fischer <i>et al.,</i> 2007
	La TSA augmente Ac-H3 et la mémoire contextuelle Nécessite l'interaction CREB/CBP	Vecsey <i>et al.,</i> 2007
	La surexpression de HDAC2 altère la mémoire contextuelle en perturbant Ac-H3 et Ac-H4 aux promoteurs de gènes de plasticité	Guan <i>et al.,</i> 2009
	Augmentation de Ac-H3K9,14 et Ac-H4K5,8,16	Peleg <i>et al.,</i> 2010
	Le Crebinostat augmente Ac-H3K9, Ac-H4K12 et la mémoire contextuelle	Fass <i>et al.,</i> 2012
Reconnaissance d'objet	La TSA ou le NaB augmentent Ac-H3 et les performances mnésiques	Fontan-Lozano <i>et al.,</i> 2008
	Le NaB améliore les performances mnésiques	Stefanko <i>et al.,</i> 2009 Roozendaal <i>et al.,</i> 2010
	Le NaB améliore les performances mnésiques Nécessite l'interaction CREB/CBP	Haettig et al., 2011
	La TSA ou le MS-275 améliorent les performances mnésiques	Hawk <i>et al.,</i> 2011
	La suppression de HDAC3 ou le RGFP136 améliorent les performances mnésiques Nécessite l'interaction CREB/CBP	McQuown <i>et al.,</i> 2011
	Le NaB améliore les performances des rats âgés	Reolon <i>et al.,</i> 2011
Mémoire spatiale en piscine de Morris	Comme l'exposition à un milieu enrichi, le NaB augmente Ac-H3, Ac-H4 et l'apprentissage spatial	Fischer <i>et al.</i> , 2007
	La surexpression de HDAC2 altère l'apprentissage en perturbant l'acétylation de H3 et H4 aux promoteurs de gènes importants	Guan <i>et al.,</i> 2009
	Augmentation spécifique de Ac-H2B et Ac-H4	Bousiges et al., 2010

**Tableau 2 : Synthèse des travaux montrant l'implication de l'acétylation des histones dans les mémoires hippocampo-dépendantes.** Ac-H2B, Ac-H3 et Ac-H4 : acétylation des histones H2B, H3 et H4 ; NaB : Sodium butyrate ; TSA : Trichostatine A.
## II.D. Dérégulation de l'acétylation des histones au cours du vieillissement normal et pathologique

Le vieillissement s'accompagne d'un déclin de nombreuses fonctions mnésiques qui ne concerne pas de façon homogène tous les individus ni toutes les formes de mémoire (Pour revue, Hedden et Gabrieli, 2004). Il est essentiellement caractérisé par une diminution des fonctions préfrontales incluant la mémoire de travail, ou mémoire à court terme. Concernant la mémoire à long terme, le vieillissement s'accompagne d'une détérioration relativement sélective de la composante déclarative, et épargne largement la mémoire procédurale. Ce déclin de la mémoire à long terme est classiquement relié à une altération fonctionnelle du lobe temporal médian, incluant l'hippocampe. La mémoire à long terme est également altérée par le vieillissement pathologique tel que la maladie d'Alzheimer. Ces perturbations s'accompagnent, au niveau moléculaire, d'altérations de l'expression de gènes importants pour la plasticité et la mémoire à long terme. L'acétylation des histones étant une étape clé de la transcription, une orientation nouvelle s'est fortement développée ces dernières années sur les relations existant entre les dérégulations des phénomènes d'acétylation/déacétylation et les troubles cognitifs survenant au cours du vieillissement normal et pathologique (Penner *et al.*, 2010).

Bien que certaines études montrent que le **vieillissement normal** n'entraîne pas de perturbation dans l'expression de la protéine CBP, ni dans son activité HAT ou celle de p300 (Li *et al.*, 2002; Tomas Pereira *et al.*, 2012), d'autres travaux suggèrent la présence de dérégulations des voies dépendantes de l'acétylation des histones et de CBP au cours du vieillissement (Chung *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2011). Récemment, une étude importante a démontré le rôle joué par la **perturbation de l'acétylation de l'histone H4,** chez des souris âgées de 16 mois, dans les déficits de mémoire spatiale en piscine de Morris ou de conditionnement de peur au contexte (Peleg *et al.*, 2010). De manière intéressante, les auteurs montrent que l'âge affecte spécifiquement l'acétylation de l'histone H4 sur sa lysine 12, sans altération de l'acétylation sur ses résidus lysine 5, 8 et 16 (ou des lysines 9 et 14 de l'histone H3), ni perturbation de la balance HATs/HDACs. D'une façon surprenante, la dérégulation de l'acétylation de l'acétylation de l'acétylation de la souris 12 induit une perturbation spectaculaire de la réponse transcriptionnelle dans l'hippocampe lors du conditionnement de peur au contexte (sur les 1539 gènes induits chez les souris jeunes, seulement 2 ont été également transcrits chez les souris âgées). Peleg *et al.* (2010) montrent, par la technique d'immunoprécipitation de la

chromatine, que la perte d'acétylation de H4 sur le résidu lysine 12, observée chez les individus âgés, est localisée uniquement sur les régions codantes des gènes (Figure 17).

Cependant, d'autres études récentes effectuées chez le rat âgé rapportent des résultats contradictoires quant à l'implication spécifique de l'acétylation de H4 sur sa lysine 12 dans les déficits mnésiques associés au vieillissement. D'une part, l'acétylation de l'histone H4 se trouve augmentée dans l'hippocampe de rats âgés, en condition basale et suite à un apprentissage mêlant des essais indicés et spatiaux en piscine de Morris (Castellano *et al.*, 2012). D'autre part, chez le rat âgé, les altérations de la PLT et la diminution de la densité des épines dendritiques s'accompagnent d'un déficit d'acétylation des résidus lysine 9 de l'histone H3 et lysine 12 de l'histone H4 aux promoteurs du gène *bdnf*, d'une augmentation de l'expression de HDAC2 ainsi que d'une diminution de l'expression de CBP dans l'hippocampe (Zeng *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données convergeant vers l'hypothèse selon laquelle une diminution de l'acétylation des histones serait impliquée dans les déficits mnésiques associés au vieillissement (Figure 17), les effets promnésiants des IHDACs ont été testés chez des individus âgés. En premier lieu, l'injection post-apprentissage de SAHA ou de sodium butyrate, dans l'hippocampe de souris âgées, permet de rétablir les niveaux d'acétylation de H4 sur la lysine 12 tout en restaurant les performances mnésiques en conditionnement de peur au contexte (Peleg et al., 2010). A l'inverse, le MS-275, qui ne rétablit pas l'acétylation de H4, n'a aucun effet au niveau comportemental, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle majeur de l'acétylation H4 sur sa lysine 12 dans la régulation de gènes essentiels à la mémoire à long terme. De la même manière, un traitement de tranches d'hippocampe à la TSA, en augmentant l'acétylation de H3 sur sa lysine 9 et de H4 sur sa lysine 12, rétablit la PLT et augmente la densité des épines dendritiques, ainsi que les niveaux de BDNF, chez les rats âgés (Zeng et al., 2011). Corroborant ces données, l'injection systémique de sodium butyrate, immédiatement après l'apprentissage, améliore les performances de rats âgés dans une tâche de reconnaissance d'objet (Reolon et al., 2011). Enfin, l'administration systémique chronique ou aigüe d'IHDACs (TSA ou sodium butyrate) avant l'apprentissage rétablit également les performances mnésiques chez des modèles de vieillissement accéléré (Fischer et al., 2007; Fontan-Lozano et al., 2008). Par exemple, les travaux de Fischer et al. (2007) révèlent que l'administration intra-péritonéale de sodium butyrate, pendant quatre semaines, permet de réduire les déficits de conditionnement contextuel ou de mémoire spatiale en piscine de Morris dans un modèle inductible de neurodégénérescence (Fischer et al., 2007).



**Figure 17 : Perturbation de l'acétylation des histones au cours du vieillissement normal** (adapté de Stilling et Fischer, 2011). Un stimulus environnemental qui initie la consolidation de la mémoire entraine une augmentation de l'acétylation des histones au niveau du promoteur mais aussi au niveau des régions codantes de gènes impliqués dans l'apprentissage. Dans le cadre du vieillissement, un déficit d'acétylation (et notamment sur la lysine 12 de l'histone H4) est observé spécifiquement au niveau des régions codantes. En conséquence, l'expression des gènes normalement transcrits après un apprentissage, ainsi que la consolidation de la mémoire sont perturbées. L'altération du métabolisme cellulaire, la dérégulation de la balance histones acétyltransférases (HATs) / histones déacétylases (HDACs), ainsi que des facteurs de risques environnementaux et génétiques contribueraient également à ces perturbations liées au vieillissement. L'administration d'inhibiteurs des HDACs (IHDACs), en rétablissant les niveaux d'acétylation de H4, contrecarre le déclin mnésique lié à l'âge.

Des perturbations des mécanismes d'acétylation/déacétylation des histones semblent également être impliquées dans le **vieillissement pathologique** et notamment dans la maladie d'Alzheimer. Dans le cadre des relations existant entre maladie d'Alzheimer et acétylation des histones, Bousiges *et al.* (2010) montrent que, chez des rats porteurs de lésions expérimentales des réseaux neuronaux détruits au cours de la maladie d'Alzheimer, les déficits de mémoire spatiale en piscine de Morris sont associés à une diminution de l'acétylation de H2B aux promoteurs des gènes *bdnf* et *zif268* ainsi que de l'expression de la protéine CBP (Bousiges *et al.*, 2010).

De plus, des souris dont les gènes des *préséniline 1* et *préséniline 2* ont été invalidés spécifiquement dans le cortex, constituant un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, présentent une diminution des taux d'ARNm et de protéine CBP et une hypoacétylation de H4 (Francis *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2007). Ces souris présentent également une altération de la transcription de gènes régulée par le complexe CREB/CBP, telle que *bdnf* ou *fos*, ainsi qu'une altération de la PLT et de la mémoire à long terme (Saura *et al.*, 2004). D'après l'ensemble de ces travaux, la normalisation des mécanismes d'acétylation semblerait constituer une perspective prometteuse quant au développement de nouvelles thérapies visant à contrer le déclin mnésique lié à l'âge, notamment dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. En effet, l'administration systémique aigüe ou chronique d'IHDACs (TSA, SAHA, phenylbutyrate) avant l'apprentissage permet de rétablir les niveaux d'acétylation et de retarder les pertes cognitives ainsi que les dysfonctions synaptiques hippocampiques chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Francis *et al.*, 2009; Kilgore *et al.*, 2010; Ricobaraza *et al.*, 2012).

Cependant, le manque de spécificité de tels traitements envers une HDAC en particulier, ainsi que leur éventuelle toxicité amène à relativiser cette perspective thérapeutique. De plus, il existe, à ce jour, très peu d'études ayant testé leur efficacité chez l'animal âgé (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011). Enfin, il est important de noter que, dans les études rapportant un effet bénéfique des IHDACs sur la mémoire dans le cadre du vieillissement normal et pathologique, l'administration d'IHDACs est souvent systémique, parfois chronique, et/ou intervient avant les tests comportementaux. Il n'existe aucune étude rapportant l'effet de l'administration intra-hippocampique d'un IHDACs, injecté en post-apprentissage, sur la mémoire de l'animal âgé.

## Objectifs généraux des travaux de thèse

Les modifications d'acétylation des histones représentent un des mécanismes majeurs permettant de contrôler la transcription de gènes essentiels à la formation de la mémoire à long terme. Comme nous l'avons vu précédemment, les processus d'acétylation/déacétylation des histones et, en aval, l'induction de la transcription de gènes, sont altérés au cours du vieillissement normal ou de pathologies neurodégénératives, notamment dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Bousiges et al., 2010; Peleg et al., 2010). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études pharmacologiques ont décrit l'effet bénéfique des IHDACs sur l'apprentissage et la mémoire d'animaux jeunes et âgés dans des tâches comportementales impliquant l'hippocampe, notamment le conditionnement de peur au contexte et la reconnaissance d'objet (Francis et al., 2009; Kilgore et al., 2010; Peleg et al., 2010; Reolon et al., 2011; Ricobaraza et al., 2012). Ce n'est que très récemment que des études ont rapporté un rôle fonctionnel de l'acétylation des histones, plus particulièrement de H4, dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Bousiges et al., 2010). Face à l'absence de données sur les relations entre modifications d'acétylation des histones et mémoire spatiale, l'objectif général de ce travail de thèse était d'étayer l'hypothèse de l'implication différentielle de l'acétylation des histones H3 et H4 lors de la consolidation d'une forme de mémoire « déclarative », dépendante de l'hippocampe (apprentissage spatial), et d'une forme de mémoire « procédurale », dépendante du striatum (apprentissage indicé), en piscine de Morris chez la souris. En utilisant une approche pharmacologique visant à inhiber les HDACs spécifiquement dans l'hippocampe, nous avons également cherché à savoir si l'augmentation du niveau d'acétylation pouvait améliorer les fonctions sous-tendues par l'hippocampe et modifier les interactions dynamiques existant entre les systèmes hippocampique et striatal.

Dans un premier temps, une approche comportementale basée sur l'utilisation de deux versions d'un apprentissage massé en piscine de Morris a été mise en place afin de déterminer si l'acquisition d'une épreuve spatiale ou d'une épreuve indicée repose sur des profils différents d'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe et le striatum chez des souris jeunes-adultes. Dans cette expérience, les protocoles des deux épreuves sont élaborés de telle sorte que les conditions de réalisation des deux tâches soient comparables. L'autre objectif est de dissocier, dans les deux versions d'apprentissage, les effets du vieillissement

normal sur les profils d'acétylation des histones H3 et H4 dans ces structures. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre I. Ils font l'objet de la publication 1 :

**Dagnas M**., Mons N. Region- and age-specific changes in histone acetylation by spatial and cued learning in the water maze. *Soumis à Hippocampus* 

Les systèmes de mémoire peuvent fonctionner de façon distincte, ils peuvent également coopérer ou entrer en compétition afin de sélectionner la réponse comportementale la plus adaptée à la résolution de la tâche (Jaffard et Meunier, 1993). Dans ce contexte, l'un des enjeux actuels est de déterminer quand et comment les interactions entre les systèmes de mémoire s'effectuent. L'objectif de la seconde expérience est de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'augmentation ciblée de l'acétylation des histones hippocampiques pourrait influencer la sélection et l'utilisation de stratégies cognitives. L'approche comportementale utilisée est un test de compétition en piscine de Morris durant lequel les souris ont le choix de se diriger vers une plateforme dite « spatiale » ou vers une plateforme « indicée » (Martel et al., 2007). Une approche pharmacologique a pour but de déterminer si l'injection postapprentissage de TSA dans l'hippocampe peut faciliter la mémorisation à court et à long terme d'informations spatiales, au détriment des informations indicées, chez des souris jeunes et âgées. Une approche immunohistochimique est utilisée pour comparer les effets de l'injection intra-hippocampique de TSA sur les niveaux d'acétylation de l'histone H4 et de phosphorylation du facteur de transcription CREB dans l'hippocampe et le striatum des animaux jeunes et âgés. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre II. Ils font l'objet de la publication 2 :

**Dagnas M**., Guillou J.L., Mons N. HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *Journal of Neuroscience, sous presse*.

L'état d'acétylation/déacétylation des histones étant un processus réversible, il constitue une cible thérapeutique privilégiée afin de pallier les dysfonctionnements mnésiques liés au vieillissement normal et pathologique. Ainsi, le traitement d'animaux âgés avec des IHDACs permet de réduire leurs déficits de mémoire en conditionnement de peur au contexte et en reconnaissance d'objet (Pour revues, Haggarty et Tsai, 2011; Stilling et Fischer, 2011). Toutefois, il est important de noter qu'aucune étude n'a, à ce jour, évalué les conséquences de l'administration locale et post-apprentissage d'un IHDACs sur la mémoire spatiale d'animaux âgés. L'objectif de notre dernière série d'expériences est de **tester l'effet d'une injection intra-hippocampique de TSA, immédiatement après un apprentissage spatial massé en** 

**piscine de Morris,** d'une part sur la rétention à long terme des informations spatiales et d'autre part, sur l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe de souris jeunes et âgées. Cette expérience a également pour but d'évaluer les conséquences de l'injection intrahippocampique de TSA sur la phosphorylation de CREB dans l'hippocampe des souris jeunes et âgées, afin de préciser l'implication de CREB dans les altérations de la mémoire spatiale associées au vieillissement. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre III. Ils font l'objet de la publication 3 :

**Dagnas M**., Porte Y., Micheau J., Beracochéa D., Mons N. Post-training intra-CA1 infusion of Trichostatin A disrupts spatial memory in aged mice. En préparation.

Introduction générale - Objectifs

Matériels et méthodes

## **MATERIELS ET METHODES**

Matériels et méthodes

## A. Animaux et procédure comportementale

## A.1. Lignée et conditions d'élevage

L'ensemble des expérimentations est effectué sur des souris mâles de la lignée consanguine C57Bl/6 (Charles River, L'Arbresle, France). Cette lignée est fréquemment utilisée en piscine de Morris et a largement démontré ses aptitudes dans cette épreuve comportementale (Holmes *et al.*, 2002). De plus, elle sert couramment de témoin aux performances standards dans les études de comparaison de lignées génétiquement modifiées (Schimanski et Nguyen, 2004).

A leur arrivée par lots de 20 sujets âgés de six à huit semaines, les souris sont placées en stabulation dans des cages collectives avec eau et nourriture *ad libitum*. L'animalerie, dont la température et l'hygrométrie sont contrôlées, est régulée par un cycle nycthéméral non inversé 12h/12h. Les expériences se déroulent lors de la période d'éclairement, de 7h à 19h et sont réalisées en accord avec la Directive Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC). À l'âge de test (4 mois ou 18 mois) et 1 semaine avant le début de l'expérience, les souris sont isolées avec nourriture et boisson *ad libitum*. Elles sont alors manipulées quotidiennement pendant cinq jours avant les épreuves comportementales afin de réduire les réactions de peur et d'anxiété due à la présence de l'expérimentateur.

## A.2. La piscine de Morris

Nous avons choisi d'utiliser trois tests comportementaux en piscine de Morris, afin d'évaluer différents types de mémoire. L'eau étant anxiogène pour les souris, la tâche repose sur la motivation de l'animal à trouver une plateforme échappatoire immergée. Nos expériences se déroulent selon un apprentissage massé (sur une seule journée). En effet, nous avons mis au point un protocole permettant de réaliser un apprentissage sur une courte période de temps et ainsi, de clairement dissocier les différentes phases de la mémoire (acquisition, consolidation, rétention). Nous avons tout d'abord utilisé une version classique de la piscine de Morris, évaluant la mémoire spatiale. L'animal doit trouver la plateforme fixe non visible à partir de n'importe quel point grâce à des indices visuels présents dans l'environnement. A ce titre, le paradigme comportemental de la piscine de Morris est aujourd'hui reconnu comme un excellent test de la mémoire déclarative, faisant intervenir l'hippocampe (Morris *et al.*, 1982; D'Hooge et De Deyn, 2001) et est très largement utilisé lors d'études sur le vieillissement (Kennard et Woodruff-Pak, 2011). Le deuxième test que nous avons utilisé permet d'évaluer la mémoire procédurale, dépendante du striatum. La plateforme est indicée et son emplacement varie à chaque essai d'apprentissage (Packard et Teather, 1997b). Ainsi, la souris n'a d'autre choix que d'utiliser l'indice présent sur la plateforme afin de localiser cette dernière. Enfin, nous avons utilisé un test de compétition, faisant intervenir les deux types de mémoire cités précédemment (Martel *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2008; Gastambide *et al.*, 2009). Lors de l'apprentissage, la plateforme est fixe mais comporte un indice. Ainsi, les souris peuvent utiliser deux stratégies différentes : utiliser les indices distaux de l'environnement ou l'indice situé sur la plateforme.

#### a) <u>Procédure générale</u>

#### • Préapprentissage

La veille de l'apprentissage spatial ou indicé, les souris sont soumises à un préapprentissage, réalisé dans une pièce différente de la pièce d'apprentissage. Ainsi, elles peuvent se familiariser avec le dispositif expérimental sans être exposées au contexte. Les animaux doivent acquérir la composante procédurale de la tâche à effectuer : « quoi faire », s'échapper de l'eau et « comment le faire », par le biais de la plateforme. Les souris sont tout d'abord placées sur la plateforme pendant 60 s puis, durant trois essais consécutifs, elles sont lâchées de trois points de départ différents et disposent de 60 s pour localiser la plateforme. En cas d'échec, les animaux sont guidés à la main vers la plateforme sur laquelle ils restent pendant 60 s.

#### • Procédure générale d'apprentissage

Au début de la séance, les souris sont amenées dans la pièce d'apprentissage par groupes de cinq ou six. Lors de chaque essai, l'animal est lâché à partir d'un point périphérique (Nord-ouest, Sud-ouest, Nord-est, Sud-est) et doit localiser la plateforme en 90 s.

En cas d'échec, il est guidé à la main par l'expérimentateur. Dans les deux cas, la souris dispose de 20 s, durant lesquelles elle peut associer les indices avec la position de la plateforme. Entre chaque essai (intervalle inter-essai de 10-12 min), la souris est séchée et placée dans sa cage, sous des lampes chauffantes, afin d'éviter toute baisse de température corporelle.

### b) Description des différents protocoles utilisés

#### • Apprentissage spatial

Les animaux doivent apprendre et mémoriser la localisation de la plateforme invisible. Cette dernière est toujours située dans le quadrant Nord-ouest et la position de départ (Sudouest, Nord-est, Sud-est) est variable d'un essai à un autre (Figure 18). Les souris sont soumises à un apprentissage massé composé de quatre blocs de trois essais, une pause de 20 min intervenant entre chaque bloc.

#### • Apprentissage indicé

Les souris doivent apprendre à associer l'emplacement de la plateforme, à un indice (cylindre comprenant des rayures noires et blanches) suspendu au-dessus de son centre. La plateforme est toujours indicée, mais sa position varie à chaque essai (Nord-ouest, Sud-ouest, Nord-est, Sud-est). Le point de départ est également pseudo-randomisé (Figure 18). Les animaux reçoivent une séance d'apprentissage massé composé de quatre blocs de trois essais, une pause de 20 min intervenant entre chaque bloc.

#### • Essais-tests

Des essais-tests sont réalisés le jour suivant les apprentissages spatial et indicé. La plateforme est alors retirée de la piscine et les souris nagent librement durant 90s. Lors de l'essai test indicé, le cylindre rayé reste suspendu au dessus de l'un des quadrants de la piscine. L'absence de plateforme permet d'évaluer la force du rappel de sa position, en analysant le niveau de persévérance à chercher dans la zone cible.



**Figure 18 : Description des trois protocoles utilisés afin de tester différents types de mémoire en piscine de Morris.** Lors de l'apprentissage spatial, la plateforme est fixe et le point de départ diffère d'un essai à l'autre selon une séquence pseudo-aléatoire. Lors de l'apprentissage indicé, la position de la plateforme, ainsi que les points de départ sont pseudo-randomisés. Lors des essais tests de ces deux protocoles, la plateforme est retirée de la plateforme est fixe et indicée et une phase d'apprentissage durant laquelle la plateforme est fixe et indicée et une phase de test durant laquelle deux plateformes sont disponibles. Les croix représentent les points de départ, le drapeau symbolise l'indice.

#### • Test de compétition

Le test de compétition en piscine de Morris se base sur des travaux précédents de l'équipe (Martel *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2007). Ce test permet d'évaluer, lors d'une situation conflictuelle d'utilisation de stratégies cognitives, quel système mnésique est préférentiellement utilisé par les animaux. Lors de l'apprentissage, la plateforme est indicée mais fixe, donc localisable spatialement. Ainsi, la tâche peut être résolue en utilisant une stratégie de type indicée ou spatiale. L'utilisation d'une stratégie par rapport à une autre dépend essentiellement du nombre d'essais d'apprentissage : après quatre essais, les animaux répondent préférentiellement par une stratégie indicée ; après 12 essais, les réponses sont majoritairement spatiales ; après 22 essais, les animaux ne présentent plus de préférence

(Martel et al., 2007). Nous avons choisi de réaliser une acquisition de huit essais où l'engagement des structures mnésiques reste conflictuel. Pour ce test, les souris ne reçoivent pas de séance de préapprentissage. Lors de l'apprentissage, la plateforme est située dans le quadrant Nord-ouest et comporte un indice (polystyrène blanc tâché de points noirs) en son centre (Figure 18). Les souris sont toujours lâchées à partir du point Sud-est. Elles peuvent donc localiser la plateforme à l'aide de l'indice présent en son centre ou en se repérant grâce à l'établissement d'une carte spatiale. L'apprentissage comporte deux blocs de quatre essais, avec une pause de 20 min entre ces deux blocs. Le test de compétition est réalisé soit une heure, soit 24h après l'apprentissage. Deux plateformes sont alors placées dans la piscine. La première se trouve à l'emplacement initial de la plateforme lors de l'apprentissage (Nordouest, plateforme spatiale) mais n'est plus indicée. La seconde comporte l'indice présenté lors de l'apprentissage mais se situe dans une nouvelle position (Sud-est, plateforme indicée). Les souris sont lâchées depuis le point Sud-ouest. Le test se déroule en trois essais avec un intervalle inter-essai de cinq min. La plateforme choisie par la souris est notée à chaque essai, afin de déterminer quelle stratégie (spatiale ou indicée) est préférentiellement mise en place par l'animal.

#### c) <u>Analyses des paramètres comportementaux</u>

Un système vidéo informatisé (Videotrack, Champagne au Mont d'Or, France) permet d'enregistrer, à chaque essai, les déplacements des animaux. Lors de l'apprentissage, divers paramètres attestant de l'évolution des performances sont analysés. Le premier paramètre utilisé est la latence (en s) nécessaire à l'animal avant d'atteindre la plateforme. Ce paramètre étant dépendant de la vitesse de nage (en cm / s), la distance parcourue avant d'atteindre la plateforme (en cm) est également analysée, afin d'écarter d'éventuels effets liés à des différences d'activité locomotrice entre les groupes (notamment lors des études menées chez les souris âgées). Une diminution de ces deux paramètres au cours des essais atteste de l'apprentissage de la tâche.

Lors des essais-tests spatiaux et indicés, la force du rappel de la position de la plateforme est évaluée en analysant le temps passé et la distance parcourue à l'emplacement virtuel de la plateforme, ainsi que le nombre d'entrées dans cette même zone, relativement aux zones équivalentes non cibles (de même taille et situées symétriquement au centre des trois autres quadrants). La persistance de la souris à nager dans la zone cible témoigne d'un bon rappel de la position de la plateforme.

Durant le test de compétition, la latence et la distance d'arrivée à l'une des deux plateformes, ainsi que le choix (plateforme spatiale ou indicée) effectué par l'animal sont analysés afin de connaître la stratégie préférentiellement mise en place par la souris.

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview 5.01 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Des analyses de variance à un ou plusieurs facteurs (Age, Traitement, Essai), ainsi que des tests t de Student appariés ou des tests du $\chi^2$  son t réalisés. Le cas échéant, des tests *post-hoc* (Fisher PLSD) viennent appuyer les analyses. Le seuil de significativité est fixé à P < 0,05. Le détail des analyses statistiques effectuées sur l'ensemble de ces données est décrit dans la section *Material and Methods* de chaque article.

## B. Chirurgie stéréotaxique et pharmacologie

## **B.1.** Implantation de guide-canules dans l'hippocampe dorsal

Les animaux sont anesthésiés par l'injection intrapéritonéale (10 mL/kg) d'un mélange de kétamine (100 mg/kg, Virbac, France) et de xylazine (6 mg/kg, Rompun Bayer, Allemagne). L'animal est alors fixé sur un cadre stéréotaxique (LPC) et une solution de lidocaïne (Xylocaine, 5%) est appliquée localement sur sa tête, avant que le crâne ne soit mis à nu. Les guide-canules (acier chirurgical ; longueur = 8 mm ;  $\emptyset$  ext. = 0,46 mm,  $\emptyset$  int. = 0,255 mm ; Le Guellec tubular components) sont descendus verticalement et maintenus grâce à 3 vis d'ancrage en acier chirurgical (pas de vis :  $\emptyset = 0.5$  mm ; longueur = 1 mm ; FOM 2000) et de ciment dentaire (PalavitG, Promodentaire). L'implantation est effectuée 1 mm audessus de la région CA1 bilatéralement selon les coordonnées suivantes, déterminées à partir de l'Atlas de Franklin et Paxinos (1997) : antérieurement - 2 mm ; latéralement  $\pm$  1,4 mm par rapport au bregma ; verticalement 0,9 mm depuis la surface du crâne. Deux sutures sont pratiquées à l'avant et à l'arrière de l'ensemble du montage. Afin d'éviter le bouchage des guides et l'entrée de poussières, des mandrins en acier inoxydable sont insérés dans les guidecanules. Les animaux sont replacés dans leur cage d'animalerie et déposés à proximité d'une source de chaleur jusqu'à leur réveil. Après la chirurgie, les souris bénéficient de 10 jours de récupération avant de débuter le protocole comportemental. Pendant cette période, les animaux sont pesés, manipulés et habitués à la contention quotidiennement afin de déceler tout incident postopératoire.

## **B.2.** Injections intra-cérébrales de Trichostatine A

Les injections bilatérales d'un inhibiteur des HDACs, la TSA (2,5  $\mu$ g/ $\mu$ L, Tocris Bioscience) ont lieu immédiatement après la fin de l'apprentissage en piscine de Morris. Une solution stock (45 mM) est préparée dans du dimethyl sulfoxide (DMSO, 20%) puis diluée 5 fois dans du liquide cérébro-spinal artificiel (ACSF, microperfusion fluid, Phymep). Des canules ( $\emptyset = 0,2$  mm ; longueur = 9 mm), reliées à des seringues Hamilton (1  $\mu$ L) via des cathéters en polyéthylène sont insérées dans les guide-canules, de manière à ce que la pointe de la canule atteigne l'hippocampe dorsal (Figure 19). Durant l'injection, les souris sont libres de tout mouvement. Les injections sont réalisées à l'aide d'un pousse-seringues. Les souris reçoivent 0,5  $\mu$ L de TSA dans chaque hippocampe, au rythme de 0,1  $\mu$ L/min, puis les canules sont maintenues an place pendant 1 min après l'injection afin de favoriser la diffusion et de limiter la remontée du produit. Le groupe « *Vehicle* » reçoit la même dose de DMSO dilué dans de l'ACSF.

## **B.3.** Contrôles histologiques

A la fin des tests comportementaux, le cerveau de chacune des souris non utilisées en immunohistochimie est prélevé afin de vérifier les implantations de guide-canules. Les animaux sont anesthésiés grâce à une injection intrapéritonéale d'avertine (10 mL/kg) puis rapidement perfusés par le ventricule cardiaque gauche avec 100 mL d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du tampon phosphate (PB) 0,1 M à pH 7,4, maintenu froid, afin de fixer les tissus. Les cerveaux sont alors délicatement prélevés et post-fixés une nuit à 4°C dans du PFA 4%. Ils sont alors transférés pour 48 h dans une solution de PB 0,1M-saccharose 30%. Des coupes frontales de 60 µm sont ensuite effectuées au microtome à congélation. Ces dernières sont montées sur lames gélatinées, colorées à la thionine puis incluses entre lames et lamelles. Elles sont enfin visualisées au microscope optique afin d'éliminer de l'expérience les animaux implantés hors de l'hippocampe.



**Figure 19 : Localisation des sites d'injection de TSA au niveau de l'hippocampe dorsal.** Les canules dépassent d'1 mm en dessous des guide-canules, ce qui permet d'atteindre l'hippocampe. Les zones en rouge constituent l'hippocampe.

### C. Immunomarquages

## C.1. Perfusion et fixation des cerveaux

Au délai post-apprentissage requis, les souris sont perfusées comme décrit précédemment (*cf.* Matériels et Méthodes B.3). Les cerveaux sont ensuite post-fixés une nuit à 4°C, sous agitation, dans du PFA 4 %. Des coupes frontales (4 lots par cerveau) de 50  $\mu$ m (pour l'immunohistochimie) ou de 35  $\mu$ m (pour l'immunofluorescence) sont alors réalisées dans du PB 0,1 M à l'aide d'un vibratome (Leica). Elles sont conservées dans une solution cryoprotectrice contenant 30% glycérol et 30 % éthylène glycol dans du PB 0,1 M. Chaque lot contient donc des coupes de l'ensemble du cerveau, deux coupes consécutives étant espacées de 200  $\mu$ m.

## C.2. Marquages immunohistochimiques et immunofluorescence

## a) Procédure générale

Tous les rinçages sont effectués dans des puits de boites de culture à 4°C pendant 15 min. Les coupes flottantes sont rincées avec du tampon Tris (TB 0,1 M, pH 7,4) et traitées avec du TB contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les coupes sont perméabilisées et les sites non spécifiques bloqués par incubation dans une solution se saturation pendant une heure à 4°C. Elles sont ensuite mises en présence des anticorps primaires dilués dans une solution de saturation, durant 48h, sous agitation à 4°C. Les coupes sont alors incubées pendant deux heures à température ambiante en présence d'anticorps secondaires de chèvre anti-lapin biotinylés (1/2000 dans du TB 0,1 M contenant 9% de NaCl (TBS), Jackson Immunoresearch) puis avec le complexe avidine-biotine-péroxydase (1/400 dans du TBS 0,1 M, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Le tableau 3 synthétise l'ensemble des anticorps utilisés. Après rinçages au TB 0,1 M, l'activité peroxydasique est révélée par l'utilisation de diaminobenzidine (0,05%) péroxydée dissoute dans du TB 0,1 M et de 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est arrêtée par trois rinçages au TB 0,1 M. Les coupes sont ensuite montées sur lames, déshydratées dans deux bains successifs de toluène et incluses entre lames et lamelles à l'aide d'une résine (Eukitt).

#### b) Immunohistochimie anti-histones H3 et H4 acétylées

L'étape d'inhibition des peroxydases endogènes a lieu pendant 10 min dans du TB 0,1 M contenant 1%  $H_2O_2$  et 10% méthanol. La solution de saturation est composée de 0,05% Tween 20 et 8% sérum normal de chèvre dans du TBS 0,1 M. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps polyclonaux de lapin anti-acétyl (Lys 14) histone H3 (1/1000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) et anti-acétyl (Lys 5,8,12,16) histone H4 (1/4000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

#### c) Immunohistochimie anti-CREB phosphorylé

Le tampon TB 0,1 M utilisé tout au long de cette procédure contient un inhibiteur de phosphatases, le fluorure de sodium (NaF, 0,25 mM). Les coupes flottantes sont traitées avec du TBS 0,1 M contenant 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 min. La solution de saturation contient 0,2 % Triton X100 0,2% sérum normal de chèvre et 2% albumine sérique bovine dans du TBS 0,1 M. Puis les coupes sont incubées dans la solution de saturation en présence d'anticorps polyclonaux de lapin anti-CREB phosphorylé (1/4000 ; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

	Anticorps	Espèce	Fournisseur	Dilution immuno- histochimie	Dilution immuno- fluorescence
Anticorps primaires	Acétyl-H3 polyclonal	Lapin	Upstate Biotechnology	1/1000	
	Acétyl-H4 polyclonal	Lapin	Upstate Biotechnology	1/4000	
	P-CREB polyclonal	Lapin	Upstate Biotechnology	1/4000	1/1000
	Acétyl-H4 monoclonal	Souris	Euromedex		1/1000
Anticorps secondaires	Anti-lapin biotinylé	Chèvre	Jackson Immunoresearch	1/2000	
	Anti-lapin- Alexa 568	Chèvre	Invitrogen		1/1000
	Anti-souris- fluoroprobes 488	Chèvre	Interchim		1/1000

Tableau 3: Synthèse des différents anticorps utilisés en immunohistochimie et immunofluorescence.

### d) Immunofluorescence

Le protocole de simple ou double immunofluorescence est semblable à celui de l'immunohistochimie anti-H3 et H4 acétylées en tout point excepté que les coupes ne subissent les étapes ni d'incubation avec le complexe ABC, ni de révélation à la diaminobenzidine. Après l'étape de saturation, elles sont incubées en présence d'un mélange de deux anticorps primaires monoclonal de souris anti-acétyl (Lys 5,8,12,16) histone H4 (1/1000, Euromedex) et polyclonal de lapin anti-CREB phosphorylé (1/1000; Upstate Biotechnology). Elles sont ensuite mises en présence d'anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés au fluorochrome Alexa 568 (1/1000, Invitrogen) et anti-souris couplés au fluorochrome fluoroprobes 488 (Interchim). L'ensemble des anticorps utilisés est récapitulé dans le tableau 3. Pour finir, les coupes sont directement incluses dans un milieu de montage pour immunofluorescence (Interchim) et visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DM 6000).

# C.3. Quantification du marquage immunohistochimique et analyses statistiques

La quantification du marquage s'effectue en aveugle, à l'aide d'un système d'imagerie semi-automatisé (Biocom Visiolab 2000, V4.50). Pour chaque structure examinée, une série de 6 à 8 comptages est effectuée bilatéralement, sous un grossissement X10. Les données sont ainsi moyennées, exprimées en nombre de noyaux immunopositifs par mm<sup>2</sup> et comparées à celles de souris naïves sacrifiées sans avoir subi d'apprentissage. Les résultats sont analysés grâce au logiciel Statview par ANOVA avec pour facteurs de variance l'Age, le Traitement, le type d'Entrainement ou le Délai de sacrifice. Lorsqu'un effet global ou l'interaction entre plusieurs effets apparaissent statistiquement significatifs (P < 0,05), les analyses se poursuivent par des comparaisons de groupes deux à deux à l'aide des tests *post-hocs* (Fisher PLSD).

Nous avons choisi d'analyser les différentes régions de l'hippocampe (CA1, CA3 et gyrus denté) ainsi que le striatum dorsomédian (DM) et le striatum dorsolatéral (DL). En effet, il a été largement démontré que l'hippocampe est indispensable à l'acquisition des informations spatiales (Morris *et al.*, 1982; Eichenbaum *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 2005b), alors que le striatum joue un rôle critique dans les apprentissages de type procédural (Packard et Knowlton, 2002; Yin et Knowlton, 2006; Graybiel, 2008). Les quantifications ont également été effectuées dans le noyau latéral de l'amygdale car des études montrent son implication dans la modulation de l'acquisition et dans la restitution des informations lorsqu'elles sont émotionnellement chargées, comme c'est le cas en piscine de Morris (Packard et Teather, 1998; Hatfield et McGaugh, 1999). Enfin, le cortex préfrontal est également analysé, de part sa susceptible implication dans les processus de stockage à long terme et de planification de l'action (Granon et Poucet, 1995).

Matériels et méthodes

# CHAPITRE I : Acétylation des histones hippocampiques et striatales en fonction de la nature de la tâche mnésique

Article 1 : Region- and age-specific changes in histone acetylation by spatial and cued learning in the water maze Dagnas M., Mons N. Chapitre I – Acétylation des histones en fonction de la nature de la tâche

## CHAPITRE I : Acétylation des histones hippocampiques et striatales en fonction de la nature de la tâche mnésique

## A. Introduction

Nous avons vu, au cours de l'introduction générale, que lors d'une épreuve de navigation en piscine de Morris, les systèmes striatal et hippocampique peuvent fonctionner indépendamment pour apporter des solutions nécessaires à la résolution de la tâche (White et McDonald, 2002). Ainsi, l'hippocampe est essentiel pour localiser une plateforme fixe et invisible à partir de points de départs différents, grâce à l'établissement d'une carte spatiale (Morris *et al.*, 1982; Packard et McGaugh, 1992; Packard et Teather, 1997a; Schroeder *et al.*, 2002). Le striatum, quant à lui, permet l'association simple entre la position de la plateforme et un indice visuel présent en son centre (Whishaw *et al.*, 1987; Packard et McGaugh, 1992; Devan *et al.*, 1996; Packard et Teather, 1997b; Quirarte *et al.*, 2009).

Lorsque nous avons débuté ce travail, le rôle spécifique de l'acétylation de chaque histone dans la formation de mémoires hippocampo-dépendantes était loin d'être clairement établi et apparaissait, en réalité, varier en fonction des différents types d'épreuves. Par exemple, des travaux ont montré une implication différentielle de l'acétylation des histones H3 et H4 dans la région CA1 consécutivement à deux types de conditionnement aversif connus pour solliciter différemment l'hippocampe (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006; Chwang et al., 2007). Une étude récente a également mis en évidence une régulation différente de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 au niveau de l'hippocampe lors de la formation de la mémoire spatiale en piscine de Morris (Bousiges et al., 2010). Selon ces auteurs, l'acétylation des histones H2B/H4 est impliquée spécifiquement dans le traitement des informations spatiales par l'hippocampe alors que l'acétylation de H3 est davantage réactive au contexte environnemental, celle-ci étant augmentée dans l'hippocampe quelle que soit la nature spatiale ou non spatiale de l'épreuve de navigation. Par ailleurs, une étude, chez des souris âgées, montre que seule la diminution de l'acétylation de l'histone H4 hippocampique est impliquée dans la dérégulation de l'activité transcriptionnelle de gènes de plasticité/mémoire lors la consolidation d'apprentissages de type spatial ou contextuel (Peleg et al., 2010). Partant de ces observations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la

réalisation de deux procédures d'apprentissage en piscine de Morris, permettant de dissocier une forme de mémoire déclarative (apprentissage spatial) et une forme de mémoire procédurale (apprentissage indicé) devait s'accompagner de profils différents d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau de l'hippocampe et du striatum chez la souris. Pour ce faire, nous avons comparé les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe (régions CA1, CA3 et gyrus denté) et dans le striatum dorsal ainsi que dans deux structures contrôles, le cortex préfrontal et l'amygdale de deux groupes de souris soumis à un apprentissage spatial ou indicé en piscine de Morris. Nous avons choisi un délai de sacrifice d'une heure après la fin de l'apprentissage, des études ayant montré un pic d'acétylation de H3 et H4 dans le CA1 hippocampique une heure après un conditionnement aversif (Levenson *et al.*, 2004; Chwang *et al.*, 2006) ou une épreuve spatiale (Bousiges *et al.*, 2010).

Au cours du vieillissement, toutes les formes de mémoire ne sont pas affectées de la même manière. Ainsi, la mémoire procédurale/indicée, dépendante du striatum, n'est pas perturbée lors de la réalisation de tâches en labyrinthe radiaire (Krazem *et al.*, 2003) ou en piscine de Morris (Magnusson, 1998; Frick *et al.*, 2000; Frick *et al.*, 2003). En revanche, la mémoire déclarative/relationnelle apparait très affectée par le vieillissement normal en labyrinthe radiaire (Marighetto *et al.*, 1999), comme lors de la réalisation de tâches spatiales en piscine de Morris (Fordyce et Wehner, 1993; Gallagher *et al.*, 1993; Magnusson, 1998; Magnusson *et al.*, 2007). L'une des découvertes majeures de ces dernières années concerne la démonstration, chez des souris âgées, d'un lien direct entre l'hypoacétylation de l'histone H4 dans l'hippocampe et les altérations de la plasticité synaptique ou des performances mnésiques testées en conditionnement de peur au contexte (Peleg *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011). Ces observations nous ont conduits à examiner l'**impact du vieillissement sur les capacités de rétention à long terme de deux formes de mémoire spatiale** *versus* **<b>indicée et sur l'état d'acétylation des histones H3 et H4 dans les structures hippocampique et striatale.** 

## B. Méthodologie

Des souris mâles C57BL/6 âgées de 4 mois ou de 18-20 mois ont été soumises à un apprentissage massé en piscine de Morris, composé de quatre blocs de trois essais. La moitié d'entre elles a effectué un apprentissage spatial (plateforme fixe invisible), tandis que l'autre

moitié des souris a réalisé un apprentissage indicé (plateforme immergée dont la position varie à chaque essai, marquée grâce à un indice rayé noir et blanc suspendu au dessus de celle-ci). La condition massée du protocole comportemental a pour objet de rendre homogènes les conditions de réalisation des épreuves de navigation spatiale et indicée. Les groupes d'animaux (*Spatial-Young, Cued-Young, Spatial-Aged, Cued-Aged*) ont alors été à nouveau subdivisés en deux cohortes. La moitié de l'effectif de chaque groupe a été soumise à un essai-test spatial (groupes *Spatial-Young* et *Spatial-Aged*) ou indicé (groupes *Cued-Young* et *Cued-Aged*) réalisé 24h après l'apprentissage. L'autre moitié des animaux a été sacrifiée une heure après la fin de l'apprentissage afin de quantifier les niveaux de H3 et de H4 acétylées dans le striatum, les champs hippocampiques CA1, CA3 et gyrus denté, ainsi que dans le cortex préfrontal et le noyau latéral de l'amygdale et de les comparer à ceux de souris naïves (Figure 20).



**Figure 20 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre I.** *Spatial-Young* et *Spatial-Aged* : groupes de souris jeunes et âgées ayant reçu l'apprentissage spatial. *Cued-Young* et *Cued-Aged* : souris jeunes et âgées soumises à l'apprentissage indicé. Ac-H3 et Ac-H4 : histones H3 et H4 acétylées. GD : gyrus denté ; CPF : cortex préfrontal ; LA : noyau latéral de l'amygdale.

## C. Principaux résultats et conclusions

(1) Lors de l'épreuve spatiale, les **souris âgées** présentent un léger retard d'acquisition ainsi qu'un large **déficit mnésique lors du test de rétention effectué 24h après l'apprentissage**. En effet, leur persévérance à chercher dans la zone de plateforme est fortement diminuée par rapport aux souris jeunes. En revanche, l'âge n'a aucun effet sur l'acquisition et la rétention des informations à long terme lors de l'épreuve indicée.

(2) Au niveau immunohistochimique, comparées à des souris naïves, les souris jeunes ayant réalisé l'apprentissage spatial présentent une augmentation d'acétylation des histones H3 et H4 spécifiquement dans le CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe. Dans d'autres structures cérébrales (CA3, striatum, noyau latéral de l'amygdale et cortex préfrontal), l'acétylation des deux histones n'est pas modifiée par l'apprentissage spatial. À l'inverse, l'entrainement dans la version procédurale/indicée de l'épreuve induit une augmentation d'acétylation de H3 et H4 sélectivement dans le striatum dorsal, mais pas dans les autres structures.

(3) Chez les **souris âgées**, les déficits de mémoire spatiale s'accompagnent d'une **dérégulation des niveaux d'acétylation des deux histones dans l'hippocampe.** Cette dérégulation se traduit par une hypoacétylation de H4 qui s'oppose à une hyperacétylation de H3 dans le CA1 et le gyrus denté. En revanche, l'âge a peu d'incidence sur les niveaux d'acétylation de H3 et H4 observés dans le striatum après l'apprentissage indicé.

Dans leur ensemble, nos résultats révèlent que les niveaux d'acétylation des deux histones H3 et H4 diffèrent selon la structure examinée (hippocampe versus striatum) et pour une structure donnée, selon son degré d'implication dans le type d'informations à consolider. Nos données d'imagerie sont cohérentes avec celles obtenues dans d'autres études montrant que les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe seraient dépendants du type d'apprentissage. En effet, d'autres expériences ont montré qu'un conditionnement de peur au contexte s'accompagne d'une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 (et pas de H4) alors qu'une forme différente de mémoire à long terme, l'inhibition latente induit une augmentation de l'acétylation de H4 (mais pas de H3) dans le CA1 (Levenson *et al.*, 2004).

Nos résultats comportementaux révèlent une perturbation des capacités mnésiques des souris âgées lors de l'essai-test spatial réalisé 24h après l'apprentissage. La mémoire

procédurale testée dans la version indicée de notre apprentissage massé en piscine de Morris est, quant à elle, préservée. Ces données concordent avec les travaux de la littérature montrant des altérations de la mémoire spatiale au cours du vieillissement (Fordyce et Wehner, 1993; Gallagher et al., 1993; Forster et al., 1996; Magnusson, 1998; Frick et al., 2000; Frick et al., 2003; Magnusson et al., 2007) alors que la mémoire procédurale reste intacte (Magnusson, 1998; Frick et al., 2000; Frick et al., 2003). En accord avec les travaux de Peleg et al. (2010), suggérant que l'acétylation de H4 dans l'hippocampe est nécessaire à la consolidation à long terme d'une mémoire spatiale, nos résultats montrent une forte diminution de l'acétylation de H4 sélectivement dans le CA1 et le gyrus denté du groupe Spatial-Aged. Cependant, contrairement aux données de la littérature (Peleg et al., 2010; Zeng et al., 2011), les résultats révèlent également une hyperacétylation de H3 dans l'hippocampe du groupe Spatial-Aged, ce qui pourrait refléter un mécanisme de compensation consécutif à l'hypoacétylation de H4. L'augmentation d'acétylation de H3 chez les souris âgées pourrait également résulter de la convergence de facteurs spécifiquement liés à l'apprentissage en piscine de Morris (fatigue, niveau de stress,...). En effet, d'autres études ont constaté que les niveaux de H3 acétylée sont augmentés dans l'hippocampe suite à un stress de nouveauté ou une épreuve de nage forcée (Bilang-Bleuel et al., 2005; Chandramohan et al., 2007; Chandramohan et al., 2008). Ainsi, l'hyperacétylation de H3 dans l'hippocampe pourrait traduire une réponse exacerbée au stress causé par notre paradigme comportemental chez les souris âgées.

En conclusion, cette étude renforce les données indiquant une double dissociation fonctionnelle du rôle du striatum et de l'hippocampe dans des tâches procédurales/indicées et spatiales/relationnelles. Nos résultats corroborent également ceux obtenus récemment dans une autre tâche hippocampo-dépendante, montrant que l'hypoactivation de H4 conduit à une diminution d'expression de gènes de plasticité et induit des déficits dans le test de conditionnement de peur au contexte (Peleg *et al.*, 2010). Nous montrons également une régulation opposée de l'acétylation des histones H3 (hyperacetylation) et H4 (hypoacétylation) dans l'hippocampe des souris âgées ayant reçu l'apprentissage spatial. Nos données apportent ainsi de nouveaux arguments en faveur de l'hypothèse émise par Bousiges *et al.* (2010) selon laquelle l'état d'acétylation de H4 reflèterait le niveau d'activité de structures cérébrales spécifiquement mises en jeu dans des tâches de discrimination spatiale alors que celui de H3 pourrait être un marqueur épigénétique du contexte environnemental plutôt que de l'apprentissage spatial en lui-même.

Chapitre I – Acétylation des histones en fonction de la nature de la tâche

## Region- and age-specific changes in histone acetylation by spatial and cued learning in the water maze

Dagnas M. and Mons N. \*

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

\*Corresponding Author. Tel: +33 540 00 24 60; Fax: 33 540 00 87 43.

E-mail address: nicole.mons@ u-bordeaux1.fr;

Number of Figures: 5

Number of Pages: 38

Abstract: 202 words; Introduction: 639 words; Discussion: 2108 words

Keywords: Histone, Hippocampus, Striatum, Aging, Water maze.

#### ABSTRACT

Epigenetic processes, such as histone acetylation, are critical regulators of learning and memory processes. In the present study, we investigated whether training in either a spatial or a cued water maze task undergoes differential changes of histone H3 and H4 acetylation within the hippocampus and the dorsal striatum of C57BL/6 mice. We also attempted to provide new insights into the relationships between deregulation in histone acetylation and age-associated memory deficits. In young mice, spatial training increased acetylation of histones H3 and H4 selectively in the dorsal hippocampal CA1 region and the dentate gyrus (DG) whereas cued training significantly enhanced acetylation of both histones selectively in the dorsal striatum. Our data also revealed age-related differences in histone acetylation in the hippocampus and striatum according to task demands. Specifically, age-related spatial memory deficits were associated with opposite changes of H3 (increase) and H4 (decrease) acetylation in hippocampal CA1 and DG. In the striatum of aged mice with intact cued memory, both histone acetylation levels were reduced compared with corresponding youngadults but remained well above those of cage-controls. Collectively, our findings suggest an important role for histone acetylation in regulating the relative contributions of the hippocampus and striatum to learning spatial and cued memory tasks.

#### **INTRODUCTION**

Among the cascade of molecular events underlying learning and memory processes in vertebrates, there is a general agreement that site-specific acetylation of histones, in particular H3 and H4, is involved in hippocampal long-term synaptic plasticity and contributes to several forms of hippocampus-dependent memory, including contextual fear, object recognition and spatial memory (Day and Sweatt, 2011; Sharma, 2010). The formation of contextual fear memory in rats, for example, has been associated with increased acetylation of histone H3 on Lys 14 (K14) in the CA1 region of the dorsal hippocampus (Levenson et al., 2004; Miller et al., 2008; Vecsey et al., 2007). However, latent inhibition but not contextual fear conditioning enhanced histone H4 acetylation state in the CA1 region (Levenson et al., 2004). These observations indicated that the nature of the learning task may be important in determining how acetylated histones in the hippocampus respond to behavioral experience. Accordingly, a study in rats showed that spatial water maze training induced histones H2B, H3 and H4 acetylation in the hippocampus, but only acetylated H2B and H4 were enriched at selected gene promoters related to hippocampus-dependent (spatial) memory consolidation (Bousiges et al., 2010). Furthermore, recent evidence indicated that learning-induced histone H4 acetylation, in particular H4K12, and gene transcription are impaired in the hippocampus of aged C57BL/6 mice with spatial and conditioned fear-associative memory deficits (Peleg et al., 2010). Similarly, deregulation of histories H3 and H4 acetylation and the resulting disruption of plasticity-related gene expression have been implicated in aging-related alterations in hippocampal synaptic function and/or hippocampus-dependent memory formation in rats (Castellano et al., 2012; Zeng et al., 2011). Collectively, these findings support the view that selected patterns of changes in histone H3 and H4 acetylation in the hippocampus could specifically influence the hippocampal function, thereby contributing to

the selection of relevant events in hippocampal-dependent learning and memory tasks. However, whereas studies underscored the importance of histone acetylation in hippocampusdependent (spatial) memory formation, relatively little is known regarding the regulation of histone acetylation in a striatum-dependent cued water maze task.

In the context of navigation in the Morris water maze, the dorsal hippocampus and the striatum are differentially recruited to solve the tasks, depending upon the type of learning involved (McDonald and White, 1994; White and McDonald, 2002). Specifically, the dorsal hippocampus is necessary for spatial/place learning when navigating toward hidden goals (D'Hooge and De Deyn, 2001; Morris et al., 1982) whereas the striatum is recruited to solve cued/response learning when navigating toward visible (or cued) goals (Graybiel, 2008; Packard and Knowlton, 2002; Yin and Knowlton, 2006). Thus far, research evidence has focused on regionally-specific activation of the transcription factor CREB and the consequent induction of CREB target genes such as *c-fos* in the hippocampus and dorsal striatum as molecular markers of memory processing for spatial/place and cued/response learning, respectively (Brightwell et al., 2007; Brightwell et al., 2008; Colombo et al., 2003; Martel et al., 2007; Mizuno et al., 2002; Porte et al., 2008; Sung et al., 2008). Accordingly, the temporal and spatial patterns of CREB phosphorylation in the hippocampus or the dorsal striatum were shown to depend on whether rats used place or response strategy to solve a cross maze task (Colombo et al., 2003). Reversible inhibition of CREB function in the dorsal hippocampus (CA1 region) impairs spatial memory, whereas alteration of striatal synaptic plasticity through transgenic inhibition of CREB impairs cued learning (Lee et al., 2008; Pittenger et al., 2002). In the present study, we trained mice in a spatial or a cued version of a water maze task, using experimental designs that allowed direct comparisons. We first asked whether memory consolidation after spatial or cued water-maze training undergoes differential regulation of histone acetylation within the hippocampus and the dorsal striatum. We also attempted to provide new insights into the relationships between deregulation in histone acetylation and memory deficits during normal aging.

#### MATERIAL AND METHODS

#### Animals

Male C57BL/6 mice (Charles River, L'Arbresle, France) at 4 months (n = 36) and 18 - 20 months old (n = 32) were individually housed and maintained in a temperature-controlled colony room ( $22 \pm 1^{\circ}$ C) under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 a.m). They were provided with food and water ad libitum and were daily handled (2 min per day) for 5 days before training. All experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

#### **Experimental design**

Young and aged mice were trained on either spatial or cued massed training protocol in the water maze. Then, they were assigned randomly to independent groups that were either sacrificed 1 h after training for immunohistochemistry (Spatial-Young: n = 8; Cued-Young: n = 6; Spatial-Aged: n = 7; Cued-Aged: n = 5) or subjected to a final probe test performed 24 h after training (Spatial-Young: n = 8; Cued-Young: n = 9; Spatial-Aged: n = 7; Cued-Aged: n = 8).

#### Water maze training

*Apparatus and pretraining.* Experiences were conducted in a pool (150 cm in diameter and 55 cm in height) filled with water ( $21^{\circ}C \pm 1$ ) made opaque by adding nontoxic paint. The platform (PF, 14 cm in diameter) was submerged 1 cm below water surface. The pool was placed in a room that displayed distal visual cues kept in a constant location during the entire training period.

One day prior to the acquisition phase, mice performed a pretraining session consisting of three consecutive trials in order to acquire the procedural aspects of the task and to control
motor and visual capacities. The session started with the animal standing on the hidden PF located in the middle of one quadrant of the pool for 60 s. For each trial, the mouse was allowed to search for the PF (60 s), remained on the PF (60 s) and returned to its home cage. If the mouse failed to escape, it was gently guided by hand to the PF until it was able to escape without help. Twenty four hours later, animals were trained in either a spatial (n = 30) or a cue-guided (n = 28) learning task in a water maze located in another testing room.

*Spatial training.* The spatial version consisted in a massed procedure composed of 4 consecutive blocks of 3 trials per block with an inter-block interval of ~20 min. For each trial, the mouse was placed into the pool, facing the side wall in one of the three starting locations (NE, SW, SE with PF always in NW). Animals were allowed to swim for 90 s to locate the PF. If they failed, they were guided to the PF by the experimenter. Then, mice stayed on the PF for 20 s before being dried. Between trials, mice were kept warm placing their home cage in a box equipped with dark lamps (inter-trial ~10 min).

*Cued training.* The cued version was similar to the spatial version in every respect, except that the position of the PF varied from one trial to another and was cued by a cylinder structure with black-white striped pattern suspended above the water. The starting point (NE, NW, SE and SW) were randomized from trial to trial.

*Probe tests*. Twenty four hours after training, mice were submitted to a probe trial. The mouse was allowed to swim for 90 s while the PF was removed from the pool. For cued probe test, the black-white striped cylinder was suspended above one of the four quadrants. Animal persistence to search near the target zone was analyzed.

*Quantification and analysis of behavioral data.* Animal behavior was recorded using an automated tracking system (Videotrack, Champagne au Mont d'Or, France). The acquisition performances were analysed for each trial, defined as mean path length (in cm) to escape from

the releasing point to the submerged PF. In the probe test, spatial or cued memory retention was assessed by measuring time spent or distance travelled within the PF zone as well as number of PF crossings. For training, analyses of variance (ANOVAs) with Age as between-subject factor, and Trials as the main within-subject factors were performed using StatView 5.01 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Memory performances during probe tests were analyzed using one-way ANOVA to compare the occupancy and the number of entries in the target PF *versus* the three other equivalent and equally sized PF zones, symmetrically located in the other quadrants of the pool. *Post-hoc* analyses of significant main effects were further examined using Fisher's PLSD tests. Statistical significance was defined as P < 0.05.

#### Immunohistochemistry

It was performed as previously described (Porte et al., 2011). Briefly, mice were deeply anesthetized with Avertin (10 ml / kg, i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB). Brains were stored overnight in the same fixation solution and sectioned (50 μm) on a vibratome (Leica). Free-floating sections were incubated with rabbit primary polyclonal antibodies anti-acetyl(lys14)-H3 (1:1000) and antiacetyl(lys5,8,12,16)-H4 (1:4000) (Upstate Biotechnology, Lake placid, NY). After washing, the sections were incubated with a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:2000; Jackson immunoresearch) followed by incubation with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). The peroxidase reaction was visualized by using diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. Sections were mounted on gelatine-coated slides, dehydrated and coverslipped. All images were acquired using an Olympus (BX50) and an imaging analysis system (Biocom Visiolab 2000, V4.50). For each animal, structures were anatomically defined according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997). Immunoreactive cells were counted bilaterally in the dorsal hippocampus (including CA1, CA3 and dentate gyrus (DG)), the dorsal striatum, the lateral nucleus of the amygdala and the prefrontal cortex across at least three consecutive sections. The number of positive nuclei/mm<sup>2</sup> was averaged to produce a mean and compared to that of naive home-caged controls (Young: n = 6 and Aged: n = 4). Data were then analyzed statistically with Statview 5.01 (SAS Institute, Cary, NC, USA) using two-way ANOVAs with Age and Training as between groups factors followed by *posthoc* tests when appropriate (Fisher's PLSD). Statistical significance was defined as P < 0.05.

#### RESULTS

#### Behavior

#### Spatial training

Both young and aged mice progressively learned the task over the course of spatial training, as indicated by decreasing mean path length to reach the PF across Trials 1-12 (Fig. 1A). A two-way one repeated measures ANOVA performed on these data showed significant effects of Trial ( $F_{(11,308)} = 10.33$ ; P < 0.0001) and Age ( $F_{(1,28)} = 6.06$ ; P < 0.05) but no significant Trial X Age interaction ( $F_{(11,308)} = 0.81$ ; P = 0.62). The effect of age was attributable to a delayed acquisition of the aged animals. Specifically, when compared to the young-adults, the aged animals were slower to learn the task on Trials 1-6 (Age effect:  $F_{(1,28)}$ = 5; P < 0.05) whereas there was no difference between groups on Trials 7-12 ( $F_{(1,28)} = 1$ ; P = 0.32). During the 90 s-probe test given 24 h after training, only the young mice showed a strong preference for the original target PF zone (Fig. 1B). Analysis of the time spent into the four PF zones confirmed that the young-adults spent significantly more time searching the area of the pool where the hidden PF was previously located than did aged mice (Young: 2.59  $\pm$  0.33 s ; Aged: 0.77  $\pm$  0.14 s; Fig. 1C). A two-way ANOVA yielded a significant effect of Zone ( $F_{(3,52)} = 4.96$ ; P < 0.01) and a significant Age x Zone interaction ( $F_{(3,52)} = 5.98$ ; P < 0.01). The effect of Age was not significant ( $F_{(1,52)} = 3.19$ ; P = 0.07). Similar results were obtained when analyzing the total number of PF crossings (Zone:  $F_{(3,52)} = 5.77$ ; P < 0.01; Age:  $F_{(1,52)} = 3.06$ ; P = 0.08; Zone X Age interaction:  $F_{(3,52)} = 7.52$ ; P < 0.001; Fig.1D) and swim distance spent into PF zones (Zone:  $F_{(3,52)} = 5.44$ ; P < 0.01; Age:  $F_{(1,52)} = 4.43$ ; P < 0.05; Zone X Age interaction:  $F_{(3,52)} = 5.18$ ; P < 0.01; Fig. 1E). Post-hoc tests confirmed that young mice exhibited significantly greater preference for the original target PF than aged mice in all three parameters (all P < 0.001).

#### **Cued** training

Young and aged mice equally learned the cued version of the water maze task, as attested by progressive decreases in mean swim path length to reach the PF over training trials (Fig. 2A). A repeated measures ANOVA confirmed a significant Trial effect ( $F_{(11,286)} = 5.07$ ; P < 0.0001) but not Age effect ( $F_{(1,26)} = 0.01$ ; P = 0.9) nor Trial X Age interaction ( $F_{(11,286)} = 0.51$ ; P = 0.89). During the 24h-probe test, analysis of time spent into the four PF zones confirmed that mice, independent of age, showed a strong preference for the cued zone compared with others (two-way ANOVA, Zone:  $F_{(3,60)} = 11.16$ ; P < 0.0001; Age:  $F_{(1,60)} = 0.04$ ; P = 0. 84; Zone X Age interaction:  $F_{(3,60)} = 0.07$ ; P = 0.97, Fig. 2B-C). Similar results were obtained when analyzing the number of PF crossings (Zone:  $F_{(3,60)} = 8.544$ ; P < 0.0001; Age:  $F_{(1,60)} =$ 0.03 ; P = 0.86 ; Zone X Age interaction:  $F_{(3,60)} = 0.15$ ; P = 0.92 ; Fig. 2D) and swim distance spent into PF zones (Zone:  $F_{(3,60)} = 9.73$ ; P < 0.001; Age:  $F_{(1,60)} = 0.0001$ ; P = 0.99; Zone X Age interaction:  $F_{(3,60)} = 0.09$ ; P = 0.96; Fig. 2E).

#### Region-specific effects of Training and Age on histone acetylation

We then investigated whether regulation of histone acetylation in the dorsal hippocampus and dorsal striatum varied as a function of task demands and age. To this end, mice were sacrificed 1 h after training in the spatial or the cued version of the task and learning-related changes of acetylated H3 (Ac-H3) and acetylated H4 (Ac-H4) were investigated in the dorsal hippocampal CA1 and CA3 regions, the dentate gyrus (DG) and the dorsal striatum. We also examined the learning-related changes in histone acetylation in two control regions: the lateral amygdala nucleus and the prefrontal cortex.

#### Dorsal hippocampus.

Fig. 3A-C illustrates the training-related changes of Ac-H3 in the dorsal hippocampus of young-adult and aged mice. In both age groups, levels of Ac-H3 were significantly increased in the CA1 (Fig. 3A) and the DG (Fig. 3B), but not the CA3 (Fig. 3C) after spatial training in comparison with matched naive controls (CA1 and DG: young: both P < 0.01 and Aged: both P < 0.001). Fig. 3A-C also indicated that, after spatial training, aged mice displayed greater levels of Ac-H3 in the CA1 and DG, but not in the CA3, than did young animals. In contrast, cued training did not produce significant changes in hippocampal Ac-H3, regardless of the age of animals. A two-way ANOVA on Ac-H3 in the CA1 and DG yielded significant effects of Training condition (CA1:  $F_{(1,22)} = 56.71$ ; P < 0.0001; DG:  $F_{(1,22)} = 104.56$ ; P < 0.0001) and Age (CA1:  $F_{(1,22)} = 12.30$ ; P < 0.01; DG:  $F_{(1,22)} = 4.20$ ; P = 0.05) as well as significant Training condition X Age interactions (CA1:  $F_{(1,22)} = 9.61$ ; P < 0.01; DG:  $F_{(1,22)} = 5.79$ ; P < 0.05). Further comparisons confirmed significant differences between the spatial and cued groups for hippocampal CA1 region and DG (all P < 0.01). The significant Training condition X Age interactions were attributable to greater Ac-H3 levels in aged mice after spatial training than after cued training and in comparison with spatial and cued training values in young mice (all P < 0.05).

The effects of spatial and cued training on hippocampal H4 acetylation (Ac-H4) are shown in Fig. 3D-F. Similar to Ac-H3, a significant increase of Ac-H4 occurred in the CA1 and the DG (but not the CA3) after spatial training but not cued training in young-adults (spatial *versus* naive, CA1: P < 0.001 and DG: P < 0.05). However, in sharp contrast to what was observed for hippocampal Ac-H3, Ac-H4 was not enhanced after spatial training in the CA1 and the DG of aged mice (Fig. 3D-E). A two-way ANOVA performed on Ac-H4 data yielded significant effects of Training condition (CA1:  $F_{(1,22)} = 17.99$ ; P < 0.001; DG:  $F_{(1,22)} =$ 7.27; P < 0.05), Age (CA1:  $F_{(1,22)} = 7.00$ ; P < 0.05; DG:  $F_{(1,22)} = 3.01$ ; ns) and Training condition X Age interactions (CA1:  $F_{(1,22)} = 11.84$ ; P < 0.01; DG:  $F_{(1,22)} = 4.12$ ; P = 0.05). Further comparisons confirmed significant differences between the spatial and cued-trained young groups (CA1: P < 0.001; DG: P < 0.05) and for the spatial group, between young and aged mice (CA1: P < 0.01; DG: P < 0.05). Representative images of Ac-H3 and Ac-H4 in the dorsal CA1 region of spatial and cued learners are shown in Fig. 3G and Fig. 3H, respectively.

#### Dorsal striatum.

Compared with naive controls, levels of Ac-H3 (Fig. 4A) and Ac-H4 (Fig. 4B) were significantly increased in the dorsal striatum of cued-trained young and aged mice (cued: all P < 0.001), but not spatial-trained mice. After cued training, however, levels of Ac-H3 were significantly greater in the dorsal striatum of young mice than in that of aged subjects. Two-way ANOVA on Ac-H3 data yielded significant main effects of Training condition ( $F_{(1,22)} = 55.59$ ; P < 0.0001), Age ( $F_{(1,22)} = 11.34$ ; P < 0.01) as well as a significant Training condition X Age interaction ( $F_{(1,22)} = 10.75$ ; P < 0.01). Further comparisons confirmed that the cued-trained mice displayed significantly greater Ac-H3 levels relative to spatial-trained animals, and that this effect was independent of the age (young and aged: both P < 0.0001). Other analyses further confirmed significant age differences after cued training (P < 0.05).

The effects of Training condition and Age on Ac-H4 in the dorsal striatum paralleled what was seen for Ac-H3 (Fig. 4B). A two-way ANOVA on Ac-H4 data yielded significant main effects of training condition ( $F_{(1,22)} = 36.74$ ; P < 0.0001) and Age ( $F_{(1,22)} = 20.06$ ; P < 0.001) as well as a significant Training condition X Age interaction ( $F_{(1,22)} = 6.70$ ; P < 0.05). Again, significantly greater Ac-H4 levels were observed after cued training relative to spatial training (young and aged: both P < 0.001) and young mice in the cued-trained group showed significantly higher Ac-H4 levels than corresponding aged mice (P < 0.05). Representative

images of Ac-H3 and Ac-H4 in the dorsal striatum of spatial and cued learners are shown in Fig. 4C and 4D, respectively.

#### Control regions.

To assess whether the task- and age-related changes in histone acetylation were specific to the dorsal hippocampus and dorsal striatum, additional analyses were investigated in two control regions: the lateral amygdala nucleus and the prefrontal cortex. As shown in Fig. 5, there was no evidence of a difference in Ac-H3 (Fig. 5A-B) or Ac-H4 (Fig 5C-D) between trained groups and naive controls for any of the structure examined.

#### DISCUSSION

The present study provides a detailed comparison of the region-specific changes of histone H3 and H4 acetylation in young and aged mice subjected to spatial or cued training in the water maze. The key finding of the present experiments was that histone H3 and H4 acetylation are differentially regulated in the dorsal striatum and the dorsal hippocampus as a function of the type of learning in which the animals were engaged and the age of the animals. In young mice, spatial training significantly increased H3 and H4 acetylation selectively in the dorsal hippocampal CA1 region and the DG, but not in the striatum and other control regions. In contrast, acquisition of the cued learning version of the task significantly increased acetylation state of both histones selectively in the dorsal striatum but not in the hippocampal structures. Our data also revealed age-related differences in histone acetylation as a function of task demands. Specifically, the age-related deficits in spatial memory were associated with opposite deregulation of Ac-H3 (increase) and Ac-H4 (decrease) in the dorsal CA1 region and the DG. In sharp contrast, both age groups exhibited equivalent cued performance during the 24h-probe test and the training-related changes of H3 and H4 acetylation were moderately affected by aging in the dorsal striatum. Together, these findings suggest a central role for histone acetylation in regulating learning and memory processes within the hippocampus and dorsal striatum.

The current data extend lesion and pharmacological studies showing a double dissociation between the mnemonic functions of the hippocampus and the striatum. Specifically, the hippocampus is required for acquisition of a win-shift radial maze task (McDonald and White, 1993; Packard et al., 1989) and a spatial task in the water maze (Packard and McGaugh, 1992; Packard and Teather, 1997; Schroeder et al., 2002). In

117

contrast, lesions of the dorsal striatum selectively impair acquisition of a win-stay visual discrimination task in the radial maze (McDonald and White, 1993; Packard et al., 1989) and cued water-maze tasks (McDonald and White, 1994; Packard and McGaugh, 1992; Packard and Teather, 1997; Whishaw et al., 1987). In young adult mice, levels of histones H3 and H4 acetylation in the dorsal striatum, but not in the hippocampus, were increased 60 min after cued training as compared to acetylation levels in young caged controls. In contrast, spatial training enhanced H3 and H4 acetylation levels selectively in the dorsal hippocampal CA1 region and the DG but not in the dorsal striatum. Importantly, neither cued nor spatial training produced significant changes in acetylation of histones H3 and H4 in the lateral amygdala nucleus and the prefrontal cortex. Our data suggest that changes of histone acetylation in the hippocampus and striatum can act as molecular markers of memory processing for spatial and cued learning in the water maze, respectively. The results obtained in hippocampal CA1 region and the DG from young adult rodents are consistent with previous studies reporting that enhanced hippocampal histone acetylation during the early stage of consolidation may be an important component or marker of long-term memory processes occurring after training on hippocampus-dependent tasks that have a strong spatial and/or contextual component (Bousiges et al., 2010; Chwang et al., 2006; Fontan-Lozano et al., 2008; Levenson et al., 2004; Peleg et al., 2010). However, an important finding observed here is that the magnitude of the training-related increase in hippocampal and striatal histone H3 and H4 acetylation can vary with task demands. Indeed, the magnitude of increase in spatial training-related H4 acetylation was greater than that observed for H3 acetylation in the hippocampus while the opposite was found in the striatum after cued training. Such findings suggest that H4 acetylation may play a more prominent role in hippocampus-dependent rather than striatumdependent forms of memory whereas H3 acetylation may have an important role in striatumdependent memory processing. Consistent with the present experiments, a recent study in rats demonstrated that water maze spatial training enhances histones H2B, H3 and H4 acetylation in the hippocampus, but only acetylated H2B/H4 were found to be enriched on promoters of plasticity/memory related genes such as *c-fos* or *zif268* (Bousiges et al., 2010). The authors proposed that increased H2B/H4 acetylation could represent epigenetic markers of long-term memory formation for spatial information whereas H3 acetylation could be a consequence of behavioral response to stress in the Morris water maze learning situations rather than spatial learning itself. In fact, regarding regulation of H3 acetylation in the hippocampus, glucocorticoids secreted in response to stress-related behavioral paradigms, such as forced swimming or Morris water maze learning exert long-lasting memory-modulating effects *via* the ERK1/2-MSK-1-Elk-1 pathway. This leads to enhanced histone H3 phosphorylation on Serine-10 and acetylation on Lysine 14 (H3S10p-K14ac) within the *c-fos* promoter specifically in the dentate granule neurons (Chwang et al., 2007; Gutierrez-Mecinas et al., 2011; Reul et al., 2009).

One important finding from our study is that water maze cued training, but not spatial training, significantly increased histone acetylation selectively in the dorsal striatum. Consistent with such differential regional patterns of changes in histone acetylation under spatial and cued task demands, similar training-related differences were observed for hippocampal *versus* striatal levels of phosphorylated CREB and induction of immediate early genes after training (Colombo, 2004; Colombo et al., 2003; Teather et al., 2005). Our findings may also be related to other findings that selective activation of two memory systems is correlated with dynamic changes of neurotransmitters systems such as acetylcholine (Chang and Gold, 2003; McIntyre et al., 2002) or dopamine (Gill and Mizumori, 2006; Lisman and Otmakhova, 2001). Of particular interest, pharmacological treatments activating dopamine D1 receptor or blocking D2 receptor in striatal neurons induced both histone H3 and H4 acetylation at the promoters of certain genes such as c-fos, bdnf or  $\Delta$ fosB (Kumar et al., 2005;

Li et al., 2004). Furthermore, previous studies provide strong evidence that co-administration of amphetamine-related dopamine release and HDAC inhibitors produces additive effects on striatal induced histone H4 acetylation, CREB phosphorylation and target gene expression, suggesting that amphetamine and HDAC may share and interact on a common molecular cascade in the striatum (Kumar et al., 2005; Shen et al., 2008). Indeed, recruitment of HDACs, such as HDAC1 and its homologue HDAC8, promotes the dephosphorylation of CREB by targeting phosphatase PP1 to the close proximity of CREB (Canettieri et al., 2003; Gao et al., 2009) Thus, activation of the cAMP/PKA pathway may disrupt the HDAC-CREB-PP1 complex association, resulting in enhanced CREB phosphorylation which, in turn, can recruit CBP HAT histone acetylation. Alternatively, the cAMP signalling cascade may trigger histone acetylation through direct PKA-mediated inhibition of HDAC (Ha et al., 2010; Lee et al., 2004; Mu et al., 2011).

The present study also examined the regional patterns of H3 and H4 acetylation in aged mice after training in the spatial or cued water maze task. Our behavioral data indicated that aged mice were able to learn both spatial and cued tasks. However, they exhibited hippocampus-dependent spatial memory deficits but spared striatum-dependent cued memory. Our behavioral results add to a substantial body of evidence indicating age-related defects in spatial/place memory (Fordyce and Wehner, 1993; Frick et al., 2000; Frick et al., 2003; Gallagher et al., 1993; Magnusson, 1998; Magnusson et al., 2007) whereas procedural/cued memory in visible versions of the water maze, which are not hippocampus-dependent, remained intact in advance age (Frick et al., 2000; Frick et al., 2003; Magnusson, 1998). Our results also showed that histone acetylation states were strongly deregulated in the hippocampus of aged mice after spatial training whereas minor changes were observed in the striatum after cued training. These observations suggest an association between age

differences in the regulation of histone acetylation during early consolidation and behavioral impairments.

Previous studies implicated deregulated histone acetylation in the hippocampus in agerelated declines in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent tasks in rodents (Castellano et al., 2012; Peleg et al., 2010; Zeng et al., 2011). Impairments in contextual fear have been associated with reduced H4 acetylation, specifically on lysine 12, and resulting alteration of gene transcription in the hippocampus of 16-month-old C57BL/6 mice (Peleg et al., 2010). Other studies also reported that reduced acetvlation of histone H4 in the hippocampus is involved in cognitive dysfunction specifically related to Alzheimer's disease (Francis et al., 2009; Kilgore et al., 2010). Consistent with these studies levels of histone H4 acetylation in the CA1 and DG of spatially-trained aged mice were significantly lower than in corresponding young mice and were similar to those of aged cage controls. The precise mechanisms by which aging affects H4 acetylation are unknown. Given the crucial role of HDAC2 in negatively regulating learning and memory (Guan et al., 2009), it is possible that a disruption of the fine balance between specific HATs and HDACs, in favor of HDAC2, contributes to reduced H4 acetylation in the hippocampus of aged mice. This hypothesis is consistent with recent evidence reporting that aging induces a deregulation of the HDAC/HAT balance in favor of HDAC2 upregulation in the hippocampus of aged Fisher 344 rats (Zeng et al., 2011). In addition, histone acetylation and hippocampal plasticity and memory are enhanced in HDAC2 knockout mice (Guan et al., 2009) whereas mutant mice overexpressing HDAC2 activity showed impaired hippocampus-dependent (contextual and spatial) memory, altered synaptogenesis and synaptic plasticity in hippocampal CA1 and DG neurons as well as reduced acetylation of histone H4, but not H3, in the hippocampus (Guan et al., 2009). Thus, we speculate that age-related spatial memory deficits might be due, at least in part, to reduced H4 acetylation and resulting alteration of plasticity/memory gene

transcription secondary to aging-induced HDAC2 upregulation in the hippocampus. It is unlikely, however, that reduced H4 acetylation is the only mechanism of age-related deregulation of histone acetylation as we observed that, after spatial training, levels of H3 acetylation were increased in both CA1 and DG neurons of aged mice compared with youngadults. These observations suggest that coordinated but opposite changes of H3 (increased) and H4 (decreased) acetylation levels specifically in the hippocampal CA1 region and the DG might contribute to age-associated spatial memory impairments. The fact that aging induced opposite changes of H3 and H4 acetylation in the CA1 and DG after spatial training suggests that a combination of multiple histone modifications or a failure to compensate for the loss of H4 acetylation contributes to spatial memory impairments during normal aging. In the spatial group, the age-related opposite changes in H3 and H4 acetylation appeared to be specific to the hippocampus, as we found that both histone acetylation were either weakly reduced in the aged striatum or were unaffected by aging in control regions. Moreover, the cued trainingrelated levels of histone acetylation in the striatum of aged mice were reduced compared with corresponding young-adults, but remained significantly higher than in baseline controls. Although the precise mechanisms whereby H3 acetylation was upregulated in the aged hippocampus are unknown, there are several possible explanations. One the one hand, since training in the water maze is stressful, especially under a 1-day massed schedule protocol (Akirav et al., 2001), enhanced hippocampal H3 acetylation could be a consequence of high level of stress in the aged mice. Acute social defeat exposure caused enhanced H3 acetylation in the dentate gyrus of high-responsive rats, while having no effect on H4 acetylation (Reul and Chandramohan, 2007). Moreover, studies have provided evidence that stressful events such as forced swimming or novelty stress are tightly associated with a transient increase in phospho-acetylated histone H3-positive [P(Ser10)-Ac(Lys14)-H3] and *c-fos* induction in dentate gyrus granule neurons (Bilang-Bleuel et al., 2005; Chandramohan et al., 2008;

Chandramohan et al., 2007; Reul et al., 2009). On the other hand, increased H3 acetylation in the CA1 and DG of spatial-trained aged mice may reflect a compensatory mechanism designed to counteract the age-related decrease in H4 acetylation. This interpretation is supported by findings showing that there is a compensatory change in HDAC1 expression following inhibition of HDAC activity by trichostatin A in rat hippocampal neurons (Tian et al., 2010). Further studies are needed to sort out the potential contribution of specific HDAC and HAT in aging-associated changes in histone acetylation in striatum and hippocampus-dependent memory tasks.

These findings are the first to provide evidence for a double dissociation of mnemonic functions of the hippocampus and dorsal striatum in the view of chromatin remodeling. The present results indicate that histone acetylation is regulated in a task-dependent and brain structure-specific manner shortly after acquisition of spatial and cued memory tasks in the water maze and that some of these changes are tightly associated with age-related deficits in memory function. The task-dependent changes of histone acetylation observed in the hippocampus and dorsal striatum may ultimately play a role in information storage and long-term memory consolidation by governing regionally specific patterns of plasticity/memory related gene regulation.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Bordeaux. We thank L. Decorte and A. Faugère for technical assistance and D. Panzeri, N. Argenta and J. Huard for animals care.

The authors declare no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Akirav I, Sandi C, Richter-Levin G. 2001. Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. Eur J Neurosci 14(4):719-25.
- Bilang-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De Carli S, Droste SK, Reul JM. 2005. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. Eur J Neurosci 22(7):1691-700.
- 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(13):2521-37.
- Brightwell JJ, Smith CA, Neve RL, Colombo PJ. 2007. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus. Learn Mem 14(3):195-9.
- Brightwell JJ, Smith CA, Neve RL, Colombo PJ. 2008. Transfection of mutant CREB in the striatum, but not the hippocampus, impairs long-term memory for response learning. Neurobiol Learn Mem 89(1):27-35.
- Canettieri G, Morantte I, Guzman E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, Yates JR, 3rd, Montminy M. 2003. Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. Nat Struct Biol 10(3):175-81.
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR. 2012. Agerelated memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. PLoS One 7(3):e33249.

- 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(10):2701-13.
- 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(3):815-28.
- Chang Q, Gold PE. 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. J Neurosci 23(7):3001-5.
- 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(46):12732-42.
- Chwang WB, O'Riordan KJ, Levenson JM, Sweatt JD. 2006. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. Learn Mem 13(3):322-8.
- Colombo PJ. 2004. Learning-induced activation of transcription factors among multiple memory systems. Neurobiol Learn Mem 82(3):268-77.
- Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA. 2003. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci 23(8):3547-54.
- D'Hooge R, De Deyn PP. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev 36(1):60-90.

Day JJ, Sweatt JD. 2011. Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron 70(5):813-29.

- Fontan-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Munera A, Delgado-Garcia JM, Carrion AM. 2008. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. Mol Cell Neurosci 39(2):193-201.
- Fordyce DE, Wehner JM. 1993. Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase C in mice. Neurobiol Aging 14(4):309-17.
- 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(1):131-9.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, C.
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J. 2000. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. Neuroscience 95(1):293-307.
- 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(3):187-98.
- 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(4):618-26.
- Gao J, Siddoway B, Huang Q, Xia H. 2009. Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase. Biochem Biophys Res Commun 379(1):1-5.

Gill KM, Mizumori SJ. 2006. Context-dependent modulation by D(1) receptors: differential effects in hippocampus and striatum. Behav Neurosci 120(2):377-92.

Graybiel AM. 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. Annu Rev Neurosci 31:359-87.

- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R and others. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. Nature 459(7243):55-60.
- Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Morfett H, Hesketh SA, Kersante F, Reul JM. 2011. Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 108(33):13806-11.
- Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C, Jin ZG. 2010. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 107(35):15467-72.
- 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(4):870-80.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN and others. 2005. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. Neuron 48(2):303-14.
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C. 2008. A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. Proc Natl Acad Sci U S A 105(44):17163-8.
- Lee H, Rezai-Zadeh N, Seto E. 2004. Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. Mol Cell Biol 24(2):765-73.

- 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(39):40545-59.
- Li J, Guo Y, Schroeder FA, Youngs RM, Schmidt TW, Ferris C, Konradi C, Akbarian S. 2004. Dopamine D2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. J Neurochem 90(5):1117-31.
- Lisman JE, Otmakhova NA. 2001. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. Hippocampus 11(5):551-68.
- Magnusson KR. 1998. Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. Mech Ageing Dev 104(3):227-48.
- Magnusson KR, Scruggs B, Zhao X, Hammersmark R. 2007. Age-related declines in a twoday reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. BMC Neurosci 8:43.
- Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL. 2007. Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience 150(4):743-53.
- McDonald RJ, White NM. 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. Behav Neurosci 107(1):3-22.
- McDonald RJ, White NM. 1994. Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. Behav Neural Biol 61(3):260-70.

- McIntyre CK, Pal SN, Marriott LK, Gold PE. 2002. Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. J Neurosci 22(3):1171-6.
- 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(4):599-603.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. 2002. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. Behav Brain Res 133(2):135-41.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297(5868):681-3.
- Mu S, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H and others. 2011. Epigenetic modulation of the renal betaadrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nat Med 17(5):573-80.
- Packard MG, Hirsh R, White NM. 1989. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. J Neurosci 9(5):1465-72.
- Packard MG, Knowlton BJ. 2002. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. Annu Rev Neurosci 25:563-93.
- Packard MG, McGaugh JL. 1992. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. Behav Neurosci 106(3):439-46.
- Packard MG, Teather LA. 1997. Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. Behav Neurosci 111(3):543-51.

- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L and others. 2010. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. Science 328(5979):753-6.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER. 2002. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. Neuron 34(3):447-62.
- Porte Y, Buhot MC, Mons NE. 2008. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem 15(12):885-94.
- Porte Y, Trifilieff P, Wolff M, Micheau J, Buhot MC, Mons N. 2011. Extinction of spatial memory alters CREB phosphorylation in hippocampal CA1. Hippocampus 21(11):1169-79.
- Reul JM, Chandramohan Y. 2007. Epigenetic mechanisms in stress-related memory formation. Psychoneuroendocrinology 32 Suppl 1:S21-5.
- 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(7):434-9.
- Schroeder JP, Wingard JC, Packard MG. 2002. Post-training reversible inactivation of hippocampus reveals interference between memory systems. Hippocampus 12(2):280-4.
- Sharma SK. 2010. Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. Neurosci Biobehav Rev 34(8):1234-40.

- Shen HY, Kalda A, Yu L, Ferrara J, Zhu J, Chen JF. 2008. Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. Neuroscience 157(3):644-55.
- Sung JY, Goo JS, Lee DE, Jin DQ, Bizon JL, Gallagher M, Han JS. 2008. Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. Learn Mem 15(4):183-8.
- Teather LA, Packard MG, Smith DE, Ellis-Behnke RG, Bazan NG. 2005. Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. Neurobiol Learn Mem 84(2):75-84.
- Tian F, Marini AM, Lipsky RH. 2010. Effects of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A on epigenetic changes and transcriptional activation of Bdnf promoter 1 by rat hippocampal neurons. Ann N Y Acad Sci 1199:186-93.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T and others. 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. J Neurosci 27(23):6128-40.
- Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB. 1987. Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. Behav Brain Res 24(2):125-38.
- White NM, McDonald RJ. 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77(2):125-84.
- Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. Nat Rev Neurosci 7(6):464-76.

Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW. 2011. Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. J Neurosci 31(49):17800-10.





Figure 1. Effects of 4-block trials training on spatial memory retention in young and aged mice. (A) Learning abilities of Young (open circles) and Aged (black circles) mice as measured by path length (mean  $\pm$  SEM, in cm) to reach the hidden PF over the twelve trials (T1-T12). (B-E) Spatial memory retention was evaluated during the probe test given 24 h later: (B) Swim paths from representative young (left) and aged (right) mice. The location of the hidden PF during acquisition is indicated by the black dot. Comparisons of time (C, in s), number of PF entries (D) and search distance (E, in cm) in the target PF zone (TARGET) relative to the three other PF zones (adjacent right and left: AR and AL; opposite: OPP). Bars represent mean + SEM (n = 7-8 mice per group). °°° P < 0.001 *versus* TARGET. \*\*\* P < 0.001 Young *versus* Aged mice.





Figure 2. Effects of 4-block trials training on cued memory retention in young and aged mice. (A) Learning abilities of Young (open circles) and Aged (black circles) mice as measured by path length (mean  $\pm$  SEM, in cm) to reach the cue-guided PF over the twelve trials (T1-T12). (B-E) memory retention for cue-guided PF was evaluated during the probe test given 24 h after training: (B) Swim paths from representative young (left) and aged (right) mice. The location of the cue-guided PF is indicated by the black dot. Comparisons of time (C, in s), number of PF entries (D) and search distance (E, in cm) in the target PF zone (TARGET) relative to other PF zones (adjacent right and left: AR and AL; opposite: OPP). Bars represent mean + SEM (n = 8-9 mice per group). ° P < 0.05, °° P < 0.01 and °°° P < 0.001 *versus* TARGET.

В А С Cued 16 10 10 Fold change in CA3 Fold change in DG 8 6 4 2 0 0 Young Aged Young Aged Young Aged Ε F D 10 n 10 10 Fold change in CA1 Fold change in CA3 Fold change in DG 8 6 6 6 4 4 2 2 2 0 0 0 Young Aged Young Aged Young Aged Н Ac-H3 Spatial D Young Aged Young Aged Ac-H4 Spatial Ac-H3 Cued Ac-H4 Cued

Figure 3

Spatial

Figure 3. Effects of training and age on histone acetylation in the dorsal hippocampus. Young and aged animals were killed 1 h after spatial or cued training and levels of acetylated histone H3 (Ac-H3, A-C) and histone H4 (Ac-H4, D-F) were quantified in the CA1 region (A, D), the dentate gyrus (DG, B, E) and the CA3 region (C, F). Dashed lines represent baseline levels in matched naive groups. Data are expressed as fold changes relative to naive controls + SEM (n = 5-8 per group).  $\circ$  P < 0.05,  $\circ \circ$  P < 0.01, and  $\circ \circ \circ$  P < 0.001 *versus* Naive. <sup>#</sup> P < 0.05, <sup>##</sup> P < 0.01 and <sup>###</sup> P < 0.001 Cued *versus* Spatial training. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 Young *versus* Aged mice. (G-H) Representative immunostainings for H3 (G) and H4 acetylation (H) in the dorsal CA1 region of young (left) and aged (right) mice after spatial or cued training. Scale bar: 50 µm.





Figure 4. Effects of training and age on histone acetylation in the dorsal striatum. Young and aged animals were killed 1 h after spatial and cued training and levels of acetylated histone H3 (Ac-H3, A) and histone H4 (Ac-H4, B) were quantified in the dorsal striatum. Dashed lines represent baseline levels in matched naive groups. Data are expressed as fold changes relative to naive controls + SEM (n = 5-8 per group). <sup>ooo</sup> P < 0.001 *versus* Naive. <sup>###</sup> P < 0.001 Cued *versus* Spatial training. \* P < 0.05 Young *versus* Aged mice. (C-D) Representative immunostainings for H3 (C) and H4 acetylation (D) in the dorsal striatum of young (left) and aged (right) mice after spatial or cued training. Scale bar: 50 µm.

Figure 5



Figure 5. Effects of training on histone acetylation in the prefrontal cortex and amygdala. Levels of Ac-H3 (Ac-H3, A-B) or Ac-H4 (Ac-H4, C-D) in prefrontal cortex (PFC, A, C) and in lateral nucleus of amygdala (LA, B, D) were quantified 1 h after spatial or cued training. Dashed lines indicate baseline levels in Naive mice. Data are expressed as fold changes relative to naive controls + SEM (n = 5-8 per group).

Chapitre I – Acétylation des histones en fonction de la nature de la tâche

# CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacétylases hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigation en piscine de Morris

Article 2 : HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice Dagnas M., Guillou J.L., Mons N. Chapitre II - Inhibition des HDACs et sélection de stratégies de navigation

# CHAPITRE II : Effet de l'inhibition des histones déacétylases hippocampiques sur la sélection de stratégies de navigation en piscine de Morris

## A. Introduction

Nos premières expériences montrent l'importance de l'acétylation des histones spécifiquement dans les régions cérébrales mises en jeu, en fonction de la nature de la tâche à consolider. Cependant, aucune étude n'a clairement identifié le rôle des modifications de la chromatine dans les interactions dynamiques existant entre systèmes de mémoire et aboutissant à la sélection d'une stratégie cognitive. Dans cette nouvelle série d'expériences, nous avons cherché les conséquences de l'inhibition pharmacologique des HDACs sur la sélection et l'utilisation de stratégies de navigation (spatiale *versus* indicée) dans un test de compétition en piscine de Morris.

Dans une situation ambigüe en piscine de Morris, pouvant être résolue par la mise en place d'une stratégie indicée (dépendante du striatum) ou spatiale (dépendante de l'hippocampe), des interactions compétitives peuvent se mettre en place entre systèmes striatal et hippocampique afin d'aboutir à la sélection préférentielle d'une stratégie (Martel *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Gastambide *et al.*, 2009). Il a été montré que la sélection d'une stratégie de navigation spatiale ou indicée est corrélée à une augmentation des niveaux de CREB phosphorylé ou de l'expression de gènes précoces dans la structure associée (Colombo *et al.*, 2003; Martel *et al.*, 2007; Porte *et al.*, 2008b; Sung *et al.*, 2008). Les travaux présentés dans ce chapitre sont fondés sur une étude précédente réalisée dans l'équipe et basée sur un protocole permettant de dissocier, lors d'une situation conflictuelle d'utilisation de stratégies cognitives, quel système mnésique est préférentiellement utilisé par les animaux (Martel *et al.*, 2007). Le niveau d'apprentissage (le temps d'exposition au contexte expérimental ou le nombre de répétition de la tâche) ainsi que l'âge des animaux jouent un rôle déterminant dans l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre des systèmes de mémoire (Martel *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2008).

De nombreuses études révèlent que l'administration systémique ou locale d'IHDACs permet d'améliorer la mémoire de rongeurs dans différentes tâches hippocampo-dépendantes,

telles que le conditionnement au contexte ou la reconnaissance d'objet (Pour revue, Day et Sweatt, 2011). Récemment, des arguments ont été apporté en faveur d'un effet modulateur des IHDACs sur les interactions fonctionnelles entre l'hippocampe et le cortex préfrontal (Stafford *et al.*, 2012). Ainsi, les auteurs montrent que l'injection intra-hippocampique de sodium butyrate induit des changements de plasticité préfrontale et contribue au maintien de l'extinction d'un conditionnement de peur au contexte.

Sur la base de ces données, notre étude, fondée sur une approche comportementale couplée à l'immunohistochimie (H4 acétylée et CREB phosphorylé), se propose d'étudier l'effet d'une injection intra-hippocampique de TSA, administrée juste après l'apprentissage, sur la sélection de la stratégie de navigation utilisée lors de tests de compétition réalisés à court terme et à long terme. À partir de conditions d'entrainement favorisant la sélection d'une stratégie indicée, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle **l'administration intra-hippocampique de TSA post-apprentissage pourrait favoriser la sélection et l'utilisation d'une stratégie spatiale** chez des souris jeunes et âgées. Nous avons également comparé les niveaux d'acétylation de H4 et de phosphorylation de CREB dans le CA1 et le striatum des différents groupes d'animaux.

## B. Méthodologie

Des souris mâles C57BL/6 âgées de 4 mois ou de 18-20 mois ont subi un apprentissage en piscine de Morris composé de huit essais. Cet apprentissage vise à localiser une plateforme toujours située dans le même quadrant de la piscine en utilisant soit les indices visuels disposés sur les murs de la piscine (stratégie spatiale), soit l'indice présent sur la plateforme (stratégie indicée). Immédiatement après la fin de cet apprentissage, les souris ont reçu une injection de TSA (groupes *Young-TSA* et *Aged-TSA*) ou de son solvant (groupes *Young-Veh* et *Aged-Veh*).

Les groupes d'animaux ont alors été divisés en deux cohortes afin d'évaluer l'effet de l'injection de TSA sur la stratégie préférentiellement mise en place au cours d'un test de compétition à court terme (une heure après l'apprentissage) et à long terme (24h après l'apprentissage). Ce test de compétition comprend trois essais durant lesquels deux plateformes sont présentes dans la piscine. L'une est située à l'emplacement initial de la plateforme lors de l'apprentissage (plateforme spatiale) et ne comporte pas d'indice. La seconde se situe à l'opposé et comprend l'indice présenté lors de l'apprentissage (plateforme indicée). À chaque essai, le choix de la plateforme est noté et reflète la stratégie (spatiale ou indicée) préférentiellement mise en place par la souris. Immédiatement après la fin de ce test, les animaux ont été sacrifiés afin de quantifier les niveaux de H4 acétylée et de CREB phosphorylé dans le CA1 dorsal et le striatum dorsal et de les comparer à ceux de souris naïves (Figure 21).



**Figure 21 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre II.** *Young-Veh* et *Aged-Veh* : souris jeunes et âgées ayant reçu une injection intra-hippocampique de solvant. *Young-TSA* et *Aged-TSA* : souris ayant reçu la Trichostatine A (TSA). Ac-H4 : histone H4 acétylée ; P-CREB : CREB phosphorylé.

# C. Principaux résultats et conclusions

(1) L'administration de TSA dans le CA1 favorise l'établissement d'une stratégie spatiale au détriment d'une stratégie indicée chez les souris jeunes. En effet, nos résultats comportementaux indiquent que les souris jeunes ayant reçu le solvant mettent en place une stratégie indicée après huit essais d'entrainement, lors des tests de compétition effectués aux délais d'une heure comme de 24h après l'apprentissage. En revanche, alors que la stratégie indicée prédomine également lors du test de compétition à court terme (une heure) chez les souris ayant reçu l'injection intra-CA1 de TSA, celles-ci changent de stratégie pour se diriger préférentiellement vers la plateforme spatiale lors du test de compétition effectué 24h après l'apprentissage.

(2) **Chez les souris âgées, l'injection intra-CA1 de TSA n'affecte pas le choix de la stratégie** lors des tests de compétition réalisés une heure et 24h après l'apprentissage. En effet, les souris âgées maintiennent une préférence pour la plateforme indicée lors de ces deux tests, qu'elles aient reçu la TSA ou le solvant.

(3) Les expériences d'imagerie indiquent, chez les souris jeunes, une augmentation du niveau de H4 acétylée dans le CA1, une heure après l'apprentissage, par rapport à des souris naïves. Les souris âgées présentent une hypoacétylation de H4 dans cette structure. De plus, l'administration de TSA augmente considérablement le niveau d'acétylation dans le CA1 des souris jeunes comme des souris âgées. Dans le striatum dorsal, aucune différence n'est notée entre les différents groupes de souris.

(4) L'analyse immunohistochimique révèle également une forte diminution de la phosphorylation de CREB dans le CA1 des souris âgées sacrifiées une heure après l'apprentissage, comparées aux souris jeunes. En outre, l'injection intra-CA1 de TSA ne permet pas de rétablir ces niveaux. Dans le striatum dorsal, seuls les groupes Jeunes et Agées ayant reçu le solvant présentent une augmentation des niveaux de CREB phosphorylé une heure après l'apprentissage par rapport à des animaux naïfs. De plus, les niveaux de phosphorylation de CREB dans le striatum sont plus élevés chez les deux groupes de souris âgées par rapport aux souris jeunes.

Nos données indiquent qu'après un nombre d'essais d'apprentissage relativement réduit (huit essais) et en accord avec les données précédentes (Martel *et al.*, 2007), des souris recevant une injection de solvant utilisent préférentiellement une stratégie indicée lors d'un test de compétition réalisé au délai de 24h. À l'inverse, les souris ayant reçu une injection intra-CA1 de TSA immédiatement après l'apprentissage se dirigent davantage vers la plateforme spatiale. Nos résultats corroborent certaines données récentes démontrant le rôle bénéfique de l'injection d'IHDACs, après l'apprentissage, sur la consolidation de mémoires dépendantes de l'hippocampe (Stefanko *et al.*, 2009; Haettig *et al.*, 2011; Hawk *et al.*, 2011; Reolon *et al.*, 2011).

L'effet de l'injection intra-CA1 de TSA sur la sélection de la stratégie de navigation est observé seulement lors d'un test de compétition effectué 24h et non une heure après l'apprentissage. Ceci est en accord avec des données montrant que l'administration d'IHDACs est inefficace lorsque la mémoire est testée à court terme (Fontan-Lozano *et al.*, 2008; Stefanko *et al.*, 2009; McQuown *et al.*, 2011). En effet, l'augmentation du niveau d'acétylation des histones, en favorisant l'expression de gènes nécessaires à la mémoire et à la plasticité, est une étape essentielle dans les processus de consolidation à long terme (Reolon *et al.*, 2011). Ainsi, lors de notre test de compétition, l'inhibition des HDACs hippocampiques au début de la phase de consolidation favorise la mise en place d'une stratégie spatiale au détriment de l'utilisation de la stratégie indicée.
Chez les souris âgées, l'administration intra-hippocampique de TSA ne permet pas le passage de l'utilisation d'une stratégie indicée vers la sélection d'une stratégie spatiale. En effet, elles utilisent largement la stratégie indicée lors du test de compétition effectué une heure comme 24h après l'apprentissage. Au niveau immunohistochimique, les souris âgées n'ayant pas reçu la TSA, présentent, en accord avec les résultats énoncés dans le chapitre I et les données de la littérature (Peleg et al., 2010; Zeng et al., 2011), une hypoacétylation de H4 dans le CA1 dorsal. Confirmant d'autres données de l'équipe (Porte et al., 2008a), cette perturbation de l'acétylation de l'histone H4 s'accompagne d'une altération du niveau de phosphorylation de CREB dans le CA1. De plus, alors que l'injection intra-hippocampique de TSA augmente fortement l'état d'acétylation de H4 chez les souris âgées, elle ne permet pas de restaurer le niveau de CREB phosphorylé. La lésion de l'hippocampe dorsal altère la mémoire spatiale mais au contraire, améliore la mise en place de stratégies procédurales/indicées (Martel et al., 2007; Lee et al., 2008). A l'inverse, une lésion du striatum dorsal, ainsi que l'inhibition génétique ou pharmacologique de CREB dans cette structure, favorise l'utilisation de stratégies spatiales (Lee et al., 2008; Baudonnat et al., 2011). Dans notre étude, l'induction, par le vieillissement, de changements opposés des niveaux de CREB phosphorylé dans l'hippocampe (diminution) et le striatum (augmentation), apporte un argument en faveur d'une utilisation préférentielle de la stratégie indicée. De plus, plusieurs études ont démontré que l'effet bénéfique des IHDACs sur les performances mnésiques implique la présence de CREB et son interaction avec CBP pour la transcription des gènes nécessaires à la plasticité et la mémoire (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007; Chen et al., 2010; Haettig et al., 2011). Ainsi, La TSA injectée dans le CA1, en restaurant les niveaux de H4 acétylée, tout en maintenant la phosphorylation de CREB réduite chez les souris âgées, ne permettrait pas de favoriser la consolidation d'une stratégie spatiale.

En conclusion, cette étude met en évidence le rôle de l'acétylation des histones dans les interactions dynamiques entre systèmes de mémoire. En effet, nos résultats montrent que l'injection intra-hippocampique de TSA, en augmentant l'acétylation de H4 dans le CA1 dorsal, exerce un effet modulateur sur les interactions existant entre l'hippocampe et le striatum et contribue à la sélection préférentielle d'une stratégie spatiale au détriment d'une stratégie indicée, chez les souris jeunes. En outre, nos données viennent corroborer les études récentes argumentant en faveur de la nécessité du facteur de transcription CREB pour l'effet bénéfique des IHDACs. Chapitre II - Inhibition des HDACs et sélection de stratégies de navigation

Behavioral/Cognitive

# HDAC Inhibition Facilitates the Switch between Memory Systems in Young But Not Aged Mice

## Malorie Dagnas, Jean-Louis Guillou, Thomas Prévôt, and Nicole Mons

Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5287, 33405 Talence, France

Chromatin modifications, especially histone acetylation, are critically involved in gene regulation required for long-term memory processes. Increasing histone acetylation via administration of histone deacetylase inhibitors before or after a learning experience enhances memory consolidation for hippocampus-dependent tasks and rescues age-related memory impairments. Whether acutely and locally enhancing histone acetylation during early consolidation processes can operate as a switch between multiple memory systems is less clear. This study examined the short- and long-term behavioral consequences of acute intra-CA1 administration of the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) on cue versus place learning strategy selection after a cue-guided water maze task and competition testing performed 1 or 24 h later in mice. Here, we show that intra-CA1 TSA infusion administrated immediately post-training biased young mice away from striatum-dependent cue strategy toward hippocampus-dependent place strategy under training condition that normally promotes cue strategy in vehicle controls. However, concomitant infusions of TSA with either PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into CA1 or cAMP analog, 8Br-cAMP, into dorsal striatum failed to bias young mice to place strategy use. Behavioral and immunohistochemical analyses further indicated that post-training TSA infusion in aged mice rescued aging-associated deregulation of H4 acetylation in the CA1 but failed to reverse phosphorylated CREB deficits and to produce strategy bias on the 24 h probe test. These findings suggest that post-training intra-CA1 TSA infusion promotes dynamic shift from striatum toward the hippocampal system in young but not aged animals, and support the possibility of a role for CREB in the TSA-mediated switch between these two memory systems.

## Introduction

Chromatin remodeling via acetylation at multiple lysine residues on the N-terminal tail of specific histone proteins plays a crucial role in regulating hippocampus-dependent synaptic function and long-term memory formation (Sweatt, 2009; Stilling and Fischer, 2011; Peixoto and Abel, 2013). Age-dependent declines in histone acetylation and resulting disruption of plasticityrelated target genes are key mechanisms contributing substantially to the deterioration of hippocampal synaptic function and deficits in many forms of hippocampus-dependent memory in rodents (Peleg et al., 2010; Zeng et al., 2011; Castellano et al., 2012). For example, several reports provided evidence that decreased acetylation of histone H4 in the hippocampus is implicated with associative memory declines in aged mice (Peleg et al., 2010) and in mouse models for Alzheimer's disease (Francis et al., 2009). Increasing histone acetylation via treatments with nonselective histone deacetylase (HDAC) inhibitors, such as sodium

butyrate or Trichostatin A (TSA), enhances synaptic plasticity and memory formation in young rodents (Haggarty and Tsai, 2011) and prevents or rescues memory deficits associated with aging as well as cognitive disorders in animal models of neurological diseases (Fischer et al., 2010; Stilling and Fischer, 2011). While beneficial effects of pre-training treatments with HDAC inhibitors (HDACi) on learning and memory are well established, few studies have examined how post-training administration of HDACi, by specifically acting on the consolidation phase, modulates memory (Vecsey et al., 2007; Federman et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011; Reolon et al., 2011). Post-training HDACi infusion into the hippocampus or the insular cortex strengthens long-term memory for object location and object recognition, respectively (Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011). One mechanism by which HDAC inhibition may enhance memory at the time of early consolidation processes is by increasing the strength of functional connectivity between the hippocampus and interconnected structures (Stafford et al., 2012). Whether locally enhancing histone acetylation during early consolidation processes controls the formation of multiple forms of memory remains presently unknown.

To identify the role of hippocampal histone acetylation in modulation of strategies selection and memory formation, we trained mice in a water maze task that can be solved with equal efficiency using either a striatum-based cue/response strategy or a hippocampus-based place strategy. The strategy used in retention depends on the training regimen experienced during acquisition

Received July 18, 2012; revised Dec. 7, 2012; accepted Dec. 8, 2012.

Author contributions: N.M. designed research; M.D., T.P., and N.M. performed research; M.D., J.-L.G., and N.M. analyzed data; M.D., J.-L.G., and N.M. wrote the paper.

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Bordeaux. We thank L. Decorte and A. Faugère for technical assistance and D. Panzeri, N. Argenta, and J. Huard for animals care. The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Nicole Mons, Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5287, 33405 Talence, France. E-mait: nicole.mons@u-bordeaux1.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3453-12.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/330001-+\$15.00/0

## 2 · J. Neurosci., Month XX, 2013 · 33(XX):XX-XX

and correlates with the temporal dynamic of CREB phosphorylation in the dorsal hippocampal CA1 during memory consolidation (Martel et al., 2007; Blanchard et al., 2008). We chose a training condition in which the use of the cued strategy prevails over spatial strategy to examine the modulatory influence of post-training intra-CA1 TSA infusion on consolidation processes mediated by the dorsal hippocampus and dorsal striatum in young adult and aged mice. We also investigated the effects of post-training intra-CA1 TSA infusion on cognitive strategy-specific changes in histone H4 acetylation and CREB phosphorylation. Finally, we examined whether the behavioral effects of TSA observed in young mice can be disrupted by pharmacological manipulation of CREB function in the hippocampus and dorsal striatum.

## Materials and Methods

### Animals

A total of 120 male C57BL/6 mice, aged 4 (n = 80) and 18-20 (n = 40) months, from Charles River Laboratories were individually housed in a temperature-controlled colony room (22  $\pm$  1°C) with a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) and ad libitum access to food and water. Mice were handled daily for 5 d before training. Young and aged mice that were infused with either TSA or vehicle into the CA1 immediately after water maze training and received a competition test either 1 or 24 h later (Fig. 1; for detailed methods, see Behavioral procedure, below). All mice subjected to the 1 h probe test were killed immediately after testing for immunohistochemical localizations of histone H4 acetylation and CREB phosphorylation. Changes in H4 acetylation were also performed in mice killed immediately after the 24 h probe test. The results were compared with resting values from young and aged mice infused with TSA or vehicle (Veh) and killed 1 h later directly from their home cage (Young-Veh, naive: n = 6; Aged-Veh, naive: n = 6; Young-TSA, naive: n = 5; Aged-TSA, naive: n = 4). In additional experiments, cohorts of young mice received post-training intra-CA1 TSA administration with concomitant infusion of the competitive antagonist of cAMP-induced activation of PKA cAMPs-Rp, triethylammonium salt (Rp-cAMPS) into the CA1 or cAMP analog 8-bromoadenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8Br-cAMP) into the dorsal striatum and were subjected to the 24 h probe test. All experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### Surgery

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight, i.p.) and xylasine (6 mg/kg body weight, i.p.) (Bayer) and placed in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the dorsal hippocampus (anteroposterior, -2 mm; mediolateral,  $\pm 1.4$  mm; dorsoventral, 0.9 mm; relative to dura and bregma; Fig. 1*B*), according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997). Guide cannulae were fixed to the skull with dental cement and three jewel screws. Mice from the 8Br-cAMP experiment were implanted with two sets of bilateral cannulae, one pair into the dorsal hippocampus as described previously and the second pair 1 mm above the dorsal striatum (anteroposterior, 0.9 mm; mediolateral,  $\pm 2$  mm; dorsoventral, 1.5 mm; relative to dura and bregma) according to the atlas of Franklin and Paxinos (1997). Mice were allowed to recover for 10 d before further experiments.

## Behavioral procedure

Apparatus. The experiments were conducted in a round tank, 150 cm diameter and 55 cm in height, filled with water made opaque with white



Figure 1. Schematic representation of the experimental procedure. *A*, In the eight-trial training session, both young and aged mice learned to search for a submerged cue-marked platform. *B*, Immediately post-training, mice received bilateral infusion of TSA or vehicle into the CA1. Illustration of cannulae placements in the dorsal CA1 region (arrows). *C*, During the probe test performed 1 or 24h later, mice had to choose between a submerged platform located in the same position as during the training session (place strategy) and the cue-marked platform located in the opposite quadrant of the pool (cue strategy). For detailed explanations, see Material and Methods.

nontoxic paint. The water temperature was maintained at  $21 \pm 1^{\circ}$ C. Two hidden platforms (PF, 13 cm diameter) made of transparent Plexiglas were submerged 1 cm below water surface. A 10 cm height cue (a cylinder structure with black and white striped pattern) was placed on the submerged platform to indicate its location. Several distal visual cues were placed on the walls of the water maze room.

Dagnas et al. 

 Histone Acetylation and Memory

Procedure. Mice were submitted to one training session of eight trials followed 1 or 24 h later by a series of three test trials. Acquisition consisted of a spatial and nonspatial reference memory task during which one PF remained in a fixed position and was marked by a cue. In each trial, mice were released facing the wall at a constant start position (middle of the southeast quadrant) and allowed to swim until they found and climbed onto the cued PF (northwest quadrant) or 90 s had elapsed. If a mouse failed to find the PF within 90 s, it was gently guided to the cued-platform by hand, where it was left for 20 s. After each training trial, mice were dried, returned to their home cage, and placed in a warm box equipped with dark lamps. Mice were trained in squads of five or six animals with an intertrial interval of 10–12 min and fully counterbalanced with respect of age and treatment. Escape latency (in seconds) from the releasing point to the PF was analyzed to assess learning during acquisition session.

Mice were submitted 1 or 24 h after the last training trial to three test trials (intertrial interval 5 min) in which two PF were submerged to assess the search strategy used. One PF remained in the spatial location of the training PF (northwest quadrant). The second PF, located in the opposite quadrant (southeast), was marked by the cue. The start position was equidistant from both platforms (southwest). If the animals swam to the original PF (currently hidden), a place response was noted; if the animal swam to the new and cued PF, a cue response was noted. Performance was calculated for each mouse as mean percentage of a particular response over the three test trials.

Quantification and analysis of behavioral data. A video camera mounted above the pool was used to record swim trials. Data were analyzed using an automated tracking system (Videotrack). The acquisition performances were analyzed for each trial, defined as the mean latency (in seconds) to escape from the releasing point to the submerged platform. Data were analyzed by repeated-measures ANOVAs, with Age as between-subject factor and Trial as within-subject factors, using Stat-View 5.01 (SAS Institute). For the competition tests, escape latency and swim distance were analyzed using one- or two-way ANOVAs with Age and Treatment as between-subject factors. Individual strategy selection was categorized as cue-guided or place response according to the choice made by the animal.  $\chi^2$  analyses with Yates corrections (a conservative adjustment to allow for cells with frequencies of <5) were computed to determine whether any training groups exhibited a significant tendency





**Figure 2.** Post-training intra-CA1 infusion of TSA does not affect strategy selection or memory performance during the short-term retention test. **A**, Learning curves of Young (open circles, n = 29) and Aged (gray circles, n = 30) mice during the training session. Data are expressed as mean latencies  $\pm$  SEM (in seconds) to find the platform over the eight consecutive trials. **B**, Mean percentage (+ SEM) of (cue, place) strategy selection for young and aged mice infused with TSA (Young-TSA: n = 6; Aged-TSA: n = 6) or vehicle (Young-Veh: n = 8; Aged-Veh: n = 8) and subjected to the 1 h probe test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; cue versus place strategy selection. **C**, **D**, Memory performances expressed as mean latencies + SEM (in centimeters) (**D**) to reach one of the platforms during the 1 h probe test. Young and aged mice exhibited a preference for the cue-quided platform, regardless of treatment.

to display one type of strategy selection over the three probe trials. Within-group comparison between the percentages of each strategy selection used paired *t* tests to determine which response type was preferred. For all comparisons, a probability of p < 0.05 was considered significant.

## Local drug infusion

The HDACi TSA (2.5 µg/µl; Tocris Bioscience) was dissolved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in artificial CSF (aCSF). Bilateral injections of 0.5 µl of TSA (4 nmol per side) or its vehicle were infused into the dorsal hippocampal CA1 immediately after training. Bilateral infusion took ~5 min and the cannulae were left in place for an additional 1 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tips. The Rp-cAMPS (Tocris Bioscience), a membranepermeable PKA inhibitor, was dissolved in 20% DMSO and diluted in aCSF (35.6 µg/µl; 40 nmol dissolved in 0.5 µl per side). The concentration was based on both published evidence in rats (Taylor et al., 1999; Ramos et al., 2003) and our recent study in C57BL/6 mice (Baudonnat et al., 2011). Bilateral Rp-cAMPS infusion occurred in combination with TSA infusion into the dorsal hippocampus. The cAMP analog 8Br-cAMP (Sigma-Aldrich) was dissolved in aCSF (Vehicle). The 8Br-cAMP concentration (2.5 µg/µl; 3 nmol dissolved in 0.5 µl per side) was based on previous studies (Bernabeu et al., 1997). Mice received infusion of 8BrcAMP or vehicle into the dorsal striatum immediately after training, with concomitant infusion of TSA or vehicle into the dorsal hippocampus.

## Histological controls

All surgical implantations were controlled after experiments using thionin blue coloration. Animals were anesthetized with Avertin (10 ml/kg, i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX • 3

phosphate buffer (PB). Brains were stored overnight in the same solution and then in paraformaldehyde containing 30% sucrose for 72 h before being cut in  $60 \ \mu m$  sections with a freezing microtome (Leica SM2400). After being collected onto gelatin-coated slides, brain sections were stained with thionin and coverslipped.

Immunohistochemistry and quantification Animals were deeply anesthetized with Avertin (10 ml/kg, i.p.) and perfused transcardially with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB. Brains were removed and stored overnight in the same fixation solution, sectioned (50 µm) on a vibratome (Leica) and kept in a solution containing 30% ethylene glycol, 30% glycerol, 0.1 м PB at - 20°C until processed for immunohistochemistry, as previously described (Porte et al., 2011). Free-floating sections were incubated with rabbit primary polyclonal antibodies antiacetyl(Lys5,8,12,16)H4 (1:4000) and antiphospho(ser133)-CREB (1:4000) (Millipore). The specificity of anti-acetyl(Lys5,8,12,16)H4 antibody has been previously established in rat hippocampus (Levenson et al., 2004; Tsankova et al., 2004). Then sections were incubated with a biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:2000; Jackson ImmunoResearch). This was followed by incubation with an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). The peroxidase reaction was visualized in a Tris solution containing diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. Sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped. All images were acquired using an imaging analysis system (Biocom Visiolab 2000, V4.50). For each animal, positive nuclei were quantified in

the dorsal hippocampal CA1 region and dorsal part of the striatum according to Franklin and Paxinos (1997). At least three consecutive serial sections were examined bilaterally, and the number of positive nuclei/ mm<sup>2</sup> was averaged to produce Group mean + SEM and compared with that of home cage (naive) mice. Data were statistically analyzed using software Statview 5.01 (SAS Institute) using one- or two-way ANOVAs with Age and Treatment as between-group factors followed by *post hoc* tests (Fisher's PLSD) when appropriate. The data were considered to be statistically significant when p < 0.05.

## Results

## Post-training TSA infusion into the CA1 potentiates long-term consolidation of spatial memory in young but not aged mice

During the acquisition phase, both young and aged mice learned to locate the cue-guided PF as attested by a progressive decrease in escape latencies over the eight training trials (Fig. 2A). Two-way repeated-measures ANOVA confirmed no significant effect of Age ( $F_{(1,57)} < 1; p = 0.4$ ), a significant effect of Trials ( $F_{(7,399)} = 33.73; p < 0.0001$ ) and no significant Age × Trial interaction ( $F_{(7,399)} = 1.57; p = 0.1$ ). On the 1 h competition test, analysis of the percentage of (cue, place) response strategy for each age group indicated no difference on strategy preference between TSA- and vehicle-infused animals ( $\chi^2$  comparisons: ps > 0.1). As shown in Figure 2B, both age groups showed a significant bias toward the cue-guided PF, regardless of whether or not they previously received TSA infusion (paired comparisons: p < 0.001 for Young-Veh; p < 0.01 for Aged-Veh or TSA; p < 0.05 for Young-

4 • J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX

TSA). In addition to strategies, there was no statistically significant difference between TSA- and vehicle-infused groups for performance parameters such as swim latency and distance to reach the PF (Fig. 2C,D; ps > 0.05). These results indicated that post-training TSA infusion into the CA1 did not affect short-term memory for cue learning in young and aged mice.

When examining the effects of immediate post-training infusion of TSA on learning strategy selection during the 24 h competition test, our data indicated that mice behaved differently according to their age (Fig. 3A). Analysis of the percentage of (cue, place) strategy selection for young animals indicated that the difference in the distribution of place/cue learners between TSA- and vehicleinfused groups was of borderline significance ( $\chi^2 = 3.36$ ; p = 0.06). In contrast, there was no difference on strategy preference between TSA- and vehicle-infused aged groups ( $\chi^2 < 1$ ; p = 0.5). As shown in Figure 3A, left, most of young adults previously given intra-CA1 TSA infusion showed a clear bias toward the use of the place strategy (two-tailed paired t test,  $t_{(6)} = 2,75; p = 0.033$ , whereas vehicle controls did not display significant preference but kept a bias toward the use of the cue strategy (two-tailed paired t test,  $t_{(7)} =$ -1.33; p = 0.2). Figure 3A, right, shows that aged mice displayed a clear bias toward the cue-guided strategy, regardless of whether they received TSA infusion or not (TSA, paired t test,  $t_{(7)} = 4.27$ ; p =0.003; Vehicle, paired t test,  $t_{(7)} = 4.78$ ; p = 0.002; TSA vs Vehicle, p = 0.45). Two-way ANOVAs for additional performance parameters confirmed a significant effect of Age (latency: F(1,27) = 21.78; p < 0.0001; distance:  $F_{(1,27)} = 7.69$ ; p < 0.01) and a significant Age  $\times$  Treatment interaction (both  $F_{(1,27)} > 9$ ; both p < 0.01). Post hoc comparisons indicated that young mice receiving TSA had shorter



**Figure 3.** Post-training intra-CA1 infusion of TSA facilitates the shift to the use of place strategy and enhances long-term memory performance in young but not aged mice. *A*, Top, Swim paths from a representative "place learner" of the TSA-infused young group (Young-TSA: n = 7) and representative "cue learners" of the vehicle-infused young group (Young-Veh: n = 8) and vehicle- or TSA-infused aged groups (Aged-Veh: n = 8; Aged-TSA: n = 8). Bottom, Mean percentage (+SEM) of (cue, place) strategy selection during the 24 h probe test in Young-Vehicle and Young-TSA (left), Aged-Vehicle and Aged-TSA (middle), and Rp-cAMPS/TSA young mice (right; n = 9) receiving post-training coinfusion of TSA and the PKA inhibitor Rp-cAMPS into CA1. Disruption of hippocampal CREB function completely blocked the TSA-induced bias toward the use of place strategy. *B*, *C*, Memory performances expressed as mean latencies + SEM (in seconds) (*B*) and mean distance + SEM (in centimeters) (*C*) to reach one of the platform during the 24 h probe test. Young mice infused with TSA showed greater preference for the plate platform compared with other groups. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01: cue versus place strategy;  $\frac{#}{p} < 0.05$ , \* $\frac{#}{p} < 0.01$ ;  $\frac{##}{p} < 0.001$ : main effect of Age.

latencies (p < 0.001; Fig. 3B) and swam more direct routes (p < 0.01; Fig. 3C) than did vehicle-infused young controls. Post hoc comparisons further revealed that aged mice receiving TSA displayed longer escape latencies and swim distance to reach the PF than TSA-infused young adults (both p < 0.001), whereas the vehicle-infused groups did not differ from each other (both p > 0.3). Together, these results indicated that immediate post-training TSA infusion into the CA1 facilitates long-term memory for place learning in young mice but is inefficient in aged animals.

## Blockade of cAMP-PKA pathway in dorsal CA1 interferes with the TSA-induced bias toward the use of a hippocampusbased place strategy in young mice

Previous studies have indicated that intact CREB function is required for beneficial effects of HDAC inhibition on hippocampus-dependent learning and memory (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007; Haettig et al., 2011). We therefore thought to examine the consequence of post-training blockade of cAMP-PKA-CREB pathway into the CA1 on the "place" bias effect induced by TSA infusion in young mice. To this end, young mice received concomitant intra-CA1 infusion of TSA and the cAMP inhibitor Rp-cAMPS immediately post-training and then were submitted to the 24 h competition test. Importantly, Rp-cAMPS/TSA animals kept a clear bias toward the use of the cueguided strategy (two-tailed paired *t* test,  $t_{(8)} = -3.9$ ; p = 0.004) and significantly differed from the TSA-infused young group ( $\chi^2 = 6.13$ ; p = 0.013) (Fig. 3*A*, right), supporting the hypothesis that the effects of post-training TSA infusion on hippocampus-dependent memory consolidation are dependent on hippocampal cAMP-PKA-CREB cascade.

## Dagnas et al. • Histone Acetylation and Memory

## J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX • 5



**Figure 4.** Age-dependent effects of TSA infusion on histone H4 acetylation in the dorsal hippocampus and the dorsal striatum. Animals were killed immediately after the 1 h retention test. Levels of Ac-H4 in the dorsal CA1 and the striatum from vehicle-infused young mice [Young-Veh, naive (N): n = 6; trained (T): n = 8], TSA-infused young mice (Young-TSA, naive: n = 5; trained: n = 6), vehicle-infused aged mice (Aged-Veh, naive: n = 6; trained: n = 8), and TSA-infused aged mice (Aged-TSA, naive: n = 4; trained: n = 6). **A**, Representative Ac-H4 immunostainings in the dorsal CA1 for the different naive (top) and trained (bottom) groups. Scale bar, 40  $\mu$ m. **B**, Levels of Ac-H4 in the dorsal CA1 were significantly reduced in the Aged-Veh-Trained mice relative to matched Young-Veh-Trained animals. All mice infused with TSA showed significantly greater H4 acetylation levels in the dorsal CA1 than corresponding vehicle controls, regardless of age or training condition. **C**, Neither aging nor TSA infusion significantly altered H4 acetylation in the dorsal striatum. Data are expressed as mean (+ SEM) number of positive Ac-H4 nuclei/mm<sup>2</sup>. \*\*\*p < 0.001: main effect of Training; <sup>###</sup>p < 0.001: main effect of Age.

## Effects of post-training intra-CA1 infusion of TSA on histone H4 acetylation and CREB phosphorylation

We next examined the changes in acetylated H4 (Ac-H4) in the dorsal hippocampal CA1 and dorsal striatum in groups of mice killed immediately after the 1 h competition test (Fig. 4). First, naive control mice infused with TSA displayed greater hippocampal Ac-H4 levels than age-matched vehicle controls, regardless of age (Fig. 4A, top; quantitated data, Fig. 4B). A twoway ANOVA performed on these data confirmed a significant effect of Treatment ( $F_{(1,17)} = 628$ ; p < 0.0001) but no effects of Age ( $F_{(1,17)} = 0.37$ ; p = 0.5) or Age  $\times$  Treatment interaction  $(F_{(1,17)} = 0.32; p = 0.6)$ . Second, Young-Vehicle but not Aged-Vehicle mice displayed a marked increase in the number and intensity of CA1 Ac-H4-positive neurons in response to training (Fig. 4A, bottom, B). Two-way ANOVA yielded significant effects of Age (F<sub>(1,24)</sub> = 29.71; p < 0.0001) and Training (F<sub>(1,24)</sub> = 56.63; p < 0.0001) as well as a significant Age  $\times$  Training interaction  $(F_{(1,24)} = 28.30; p < 0.0001)$ . Further analyses confirmed a significant difference between the trained Young-Vehicle and Aged-Vehicle groups (p < 0.0001). Importantly, we observed no Ageand Training-dependent changes in Ac-H4 in mice infused with TSA (both F < 3; both p > 0.1). Indeed, both trained Young-TSA and Aged-TSA groups displayed significantly greater levels of Ac-H4 in CA1 than did matched vehicle groups (Young,  $F_{(1,12)} =$ 

106; p < 0.0001; Aged,  $F_{(1,12)} = 175$ ; p < 0.0001), reaching similar levels to those observed in naive Young-TSA and Aged-TSA controls (both p > 0.05; Fig. 4A). Importantly, and as previously observed (Levenson et al., 2004), TSA infusion failed to enhance CA1 Ac-H4 levels in animals killed immediately after the 24 h probe test, underlining the transient effect of TSA on histone acetylation (data not shown). In the dorsal striatum, we found no statistically significant changes in Ac-H4 levels as a function of training status, Age, or Treatment (Fig. 4*C*).

Prompted by evidence linking CREB activation/phosphorylation to enhancement of hippocampus-dependent memory processes by TSA treatment (Vecsey et al., 2007), we next examined learning-related changes in phosphorylated CREB (P-CREB) in mice killed immediately after the 1 h competition test. In agreement with our previous study indicating that the intensity and number of CA1 P-CREB-immunopositive neurons were dramatically reduced by aging (Porte et al., 2008a), training produced an overall increase in CA1 P-CREB levels in young but not aged mice, independent of treatment condition (Figs. 5A, 6A). Namely, TSA infusion had no effect on CA1 P-CREB levels in naive control animals (Treatment,  $F_{(1,17)} = 1.7$ ; p = 0.21; Treatment × Age,  $F_{(1,17)} < 1$ ; p = 0.93). Whereas training increased P-CREB levels in CA1 from Young-Vehicle ( $F_{(1,12)} = 22$ ; p <

## 6 • J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX

0.001) and Young-TSA ( $F_{(1,9)} = 26; p <$ 0.001) mice, no training-related changes were observed in Aged-Vehicle or Aged-TSA animals (both p > 0.1; Fig. 6A, bottom). Further analyses confirmed that, regardless of whether or not they received TSA infusion, trained young mice displayed significantly greater CA1 P-CREB levels than did aged mice (Vehicle and TSA: both p < 0.001; Fig. 6A). The patterns of P-CREB in the dorsal striatum are shown in Figures 5B and 6B. No statistically significant changes were found as a function of Treatment or Age in naive control groups (Fig. 6B, top). Training resulted in significantly greater P-CREB levels in the striatum of young and aged mice and significantly differed from naive controls (Young,  $F_{(1,21)} = 6.9$ ; p = 0.01; Aged,  $F_{(1,20)} = 13.45; p = 0.001$ ). However, compared with age-matched naive controls, the levels of P-CREB in dorsal



Dagnas et al. • Histone Acetylation and Memory

**Figure 5.** Effects of TSA infusion on CREB phosphorylation in the dorsal hippocampus and the dorsal striatum. Animals were killed immediately after the 1 h retention test. Levels of P-CREB in the dorsal CA1 and the striatum from vehicle-infused young mice (Young-Veh, naive (N): n = 6; trained (T): n = 8], TSA-infused young mice (Young-TSA, naive: n = 5; trained: n = 6), vehicle-infused aged mice (Aged-Veh, naive: n = 6; trained: n = 8), and TSA-infused aged mice (Aged-TSA, naive: n = 4; trained: n = 6). A, Training-related changes of P-CREB in CA1 were significantly reduced by aging and were not rescued by TSA infusion. B, In the dorsal striatum, training significantly increased P-CREB levels in all groups except the Young-TSA group. Data are expressed as mean (+SEM) number of positive P-CREB nuclei/mm<sup>2</sup>. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001: main effect of Training; \*p < 0.05: main effect of Treatment; °°°p < 0.001: main effect of Age.

striatum were significantly increased in Young-Vehicle, Aged-Vehicle, and Aged-TSA groups (all ps < 0.05) but not Young-TSA group (p = 0.4) (Fig. 6B, bottom).

## Enhanced CREB phosphorylation in the striatum reverses the TSA-mediated switch from striatum-based to hippocampusbased memory systems

Because our immunohistochemical data indicated that, compared with age-matched naive controls, all training groups displayed high levels of striatal P-CREB except the Young-TSA group, we next examined whether the effects of intra-CA1 TSA infusion on search strategy preference are relevant to striatal CREB function. To this end, three groups of young mice (8BrcAMP/TSA, Vehicle/TSA, and Vehicle/Vehicle) received posttraining infusions of either the cAMP analog 8Br-cAMP or vehicle into the dorsal striatum with concomitant infusion of TSA or vehicle into the CA1 (Fig. 7). Cannulae placements are schematized in Figure 7A. Analyses of the percentage of strategy selection for each group during the 24 h competition test indicated significant difference in the distribution of place/cue learners between the three groups ( $\chi^2 = 10.25$ ; p = 0.0059). As shown in Figure 7B, animals of the Vehicle/Vehicle and 8Br-cAMP/TSA groups showed a significant bias toward the cue-guided PF (twotailed paired t test,  $t_{(9)} = -3.5$ ; p = 0.007 and  $t_{(9)} = -7.8$ ; p < 0.0001, respectively) whereas Vehicle/TSA animals were evenly divided between the use of place and cue strategies (twotailed paired t test,  $t_{(10)} = 0.14$ ; p = 0.8). Importantly, although Vehicle/TSA mice had more modest changes in strategy bias than Young-TSA mice in the first experiment (Fig. 3A), significant differences in percentage of strategy selection were found between the Vehicle/TSA and the 8Br-cAMP/TSA (p = 0.006) and the Vehicle/Vehicle (p = 0.031) groups.

## Discussion

When either of two competing (i.e., place and cue/response) strategies can lead to successful resolution of a task, micepredominantly adopt the striatum-dependent cue-guided strategy after a short training regimen, whereas the preference for using a hippocampus-dependent place strategy comes to dominate on the condition that training or preexposure to the spatial environment is sufficient (Nicolle et al., 2003; Martel et al., 2006; , 2007; Sung et al., 2008; Tunur et al., 2010). This is the first study to demonstrate that post-training infusion of TSA in CA1 of young mice facilitates the shift from the use of a striatumdependent cue/response strategy toward the use of hippocampus-dependent place strategy under training conditions that promote cue-based strategy in vehicle-infused controls. However, this biasing effect of post-training infusion of TSA was observed only in young mice and when probe test was assessed 24 h after learning, indicating that inducing histone hyperacetylation at the time of early consolidation processes promotes transcription of genes required for long-term memory. We provide evidence that inhibiting hippocampal cAMP-PKA-CREB pathway in young mice receiving concomitant infusion of TSA and PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into CA1 disrupts the switch from predominantly cue to place strategy preference. Posttraining TSA infusion in aged mice rescues aging-associated deregulation of H4 acetylation in the CA1 but fails to reverse P-CREB deficits or to produce a place strategy bias on the 24 h probe test. We further demonstrate that concomitant infusion of intra-CA1 TSA with the cAMP analog, 8Br-cAMP, into the dorsal striatum prevents TSA-infused young mice from predominantly using place strategy. All these findings highlight that posttraining intra-CA1 TSA infusion promotes dynamic shift from striatal toward hippocampal memory system in young but not aged animals, and support the possibility of a critical role for CREB in the TSA-mediated switch between these two memory systems.

Systemic or intracerebral administration of HDACi before training facilitates the formation of hippocampus-dependent memory for spatial learning (Fischer et al., 2007; Dash et al., 2009; Ricobaraza et al., 2009), contextual associative fear conditioning (Levenson et al., 2004; Lattal et al., 2007; Kilgore et al., 2010; Peleg et al., 2010), or novel object recognition (Fontán-Lozano et al., 2008; Giralt et al., 2012). In contrast, only a few works have investigated the modulating effects of post-training HDAC inhibi-

## Dagnas et al. • Histone Acetylation and Memory

## J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX • 7



Figure 6. Representative photomicrographs of P-CREB-immunopositive nuclei within the CA1 (A) and the dorsal striatum (B) from naive (top) and trained (bottom) groups of young and aged animals infused with vehicle or TSA. All trained mice were killed immediately after the 1 h retention test. Scale bar, 50  $\mu$ m.



**Figure 7.** Striatal CREB phosphorylation is critical for the switch from predominantly striatum-based cue to hippocampus-based place strategy. Young mice received post-training intrahippocampal injection of either vehicle or TSA concomitant with intrastriatal administration of vehicle (Veh/Veh: n = 10; Veh/TSA: n = 11) or cAMP analog, 8Br-cAMP/RSA: n = 10) to increase CREB phosphorylation in the striatum. **A**, Top, Representative views of injection sites in the dorsal striatum (left) and the hippocampus (right) showing tracks of guide cannulae (arrows). Bottom, Histological controls of all stereotaxically implanted mice. Black dots show locations of the tip of injection cannulae. **B**, Mean percentage (+SEM) of (cue, place) strategy selection during the 24h probe test. In contrast to Veh/TSA animals, no switch from the use of cue to place strategy preference was observed in 8Br-cAMP/TSA and Veh/Veh groups of mice. \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001: cue versus place response;  $\frac{#}{p} < 0.05$ ,  $\frac{##}{p} < 0.01$ : main effect of Treatment.

## 8 • J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX

tion on memory. Studies have shown that intrahippocampal infusion of HDACi immediately after learning enhances longterm memory processes without affecting short-term memory by specifically influencing the consolidation phase (Vecsey et al., 2007). Further, intrahippocampal HDAC inhibition during early memory consolidation can generate a form of long-term memory that persists beyond the point at which normal memory fails (Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011). Consistent with these findings, our behavioral results in young mice indicate that inducing histone hyperacetylation in the dorsal hippocampus immediately after learning is sufficient to modulate long-term, but not short-term, memory formation and to control the establishment of different kinds of memory by interacting brain systems during consolidation. Specifically, vehicle-infused young mice subjected to eight-trial acquisition predominantly expressed a cue-guided response independently of the time interval (1 or 24 h) interposed between the acquisition and test sessions. In contrast, TSA-infused young mice predominantly used the cue strategy on the 1 h probe test but switched to the place strategy on the 24 h probe test. These observations suggest that inducing histone hyperacetylation into the CA1 immediately after training does not interfere with short-term memory but facilitates longterm consolidation of spatial information after a training regimen that normally promotes memory consolidation for simple associations between specific behaviors and selective cues. These results further highlight a critical role for histone acetylation into the hippocampus in regulating cellular connectivity between interacting memory systems during consolidation processes. Specifically, post-training intra-CA1 TSA infusion in young mice facilitated switching from striatum- to hippocampus-dependent memory strategy on the 24 h retention test. Consistent with previous observation of a dynamic hippocampus-striatum interplay during the consolidation period (Martel et al., 2007), these findings suggest that increasing hippocampal histone acetylation immediately after training blocks striatum-based cued memory and promotes the formation of hippocampus-dependent spatial memory.

In the hippocampus, remodeling of chromatin via regulation of histone acetylation constitutes a key mechanism to controlling subsets of genes implicated in associative memory formation (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006; Fischer et al., 2007; Peleg et al., 2010; Sharma, 2010). Accordingly, histone H4 acetylation-dependent transcriptional events in the dorsal hippocampus occur selectively during the consolidation phase (30-60 min after training) of long-term contextual fear memory in mice (Peleg et al., 2010) and spatial memory in rats (Bousiges et al., 2010). Our finding that young mice displayed increased H4 acetylation during the early phase of consolidation (at 1 but not 24 h after learning) is in line with a permissive role for acetylated histones in upregulating subsets of activity-associated genes implicated in plasticity and memory (Levenson et al., 2004). Furthermore, while immediate post-training TSA infusion produced strategy shift on the 24 h retention test, TSA-induced H4 hyperacetylation occurred 1 h, but not 24 h, after training, arguing in favor of a causal role for histone acetylation in the rapid molecular mechanisms engaging transcription-dependent pathways necessary for memory consolidation (Federman et al., 2009; Stefanko et al., 2009; Reolon et al., 2011). This is also consonant with recent observations that increasing hippocampal histone acetylation at the time of early consolidation processes promotes transcription of genes required for

## Dagnas et al. • Histone Acetylation and Memory

long-term memory formation by influencing the strength of functional connectivity between the hippocampus and interconnected structures (Stafford et al., 2012).

Studies in both aged mice (Peleg et al., 2010) and rats (Zeng et al., 2011) have found that reduced histone H4 acetylation in the hippocampus correlates with impaired spatial or contextual memory and that treatments with HDACi before training rescue these deficits. Immediate post-training systemic HDACi administration also efficiently reversed aging-related object recognition memory declines in rats (Reolon et al., 2011). An unexpected result from our study is that, in sharp contrast to previous findings, post-training intra-CA1 TSA infusion rescued the ageassociated decrease in H4 acetylation but was not sufficient to bias an aged animal toward the use of place strategy on the 24 h probe test. In addition, post-training TSA infusion was unable to reverse reduced P-CREB levels in aged CA1 neurons, suggesting that post-training TSA infusion, by restoring/enhancing H4 acetylation while keeping P-CREB at low levels in the CA1, might not be sufficient to bias the aged brain toward the use of a hippocampus-based place strategy. These observations are in contrast to recent findings wherein restoration of histone H4 lysine 12 acetylation in aged mice receiving intrahippocampal infusion of the HDACi suberoylanilide hydroxamic acid reinstates the expression of learning-induced genes and leads to the recovery of associative learning behavior (Peleg et al., 2010). We found that a shift toward a place strategy can be prevented by coadministration of TSA with the PKA inhibitor, Rp-cAMPS, into the CA1, which is consistent with studies reporting that HDACi modulates hippocampus-dependent memory in a CREB-dependent manner (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007; Chen et al., 2010; Haettig et al., 2011). These findings and recent evidence that modification-specific, bidirectional chromatin regulation is dependent on recent experience, age, and hippocampal subfields (Castellano et al., 2012) caution that use of HDACi may have hazardous consequences when treating cognitive disorders, especially those associated with CREB deficits.

Consistent with previous reports indicating that specific forms of memory depend on region-specific patterns of P-CREB (Pittenger et al., 2002; Colombo et al., 2003; Martel et al., 2007; Lee et al., 2008; Porte et al., 2008b, 2011; Sung et al., 2008), predominant cue search strategy in Aged-Vehicle and Aged-TSA animals was associated with high P-CREB levels in the striatum but not the hippocampus. In contrast, the use of place strategy in Young-TSA mice correlated with high P-CREB in the hippocampus but not striatum, suggesting that P-CREB provides a signature in the hippocampus of TSA-infused young mice that coincides with their bias in selecting place strategy. To gain further insight into the role of CREB in modulating cognitive strategies, young mice received coinfusion of TSA into CA1 and cAMP analog, 8Br-cAMP, into the dorsal striatum. Importantly, young mice infused with 8Br-cAMP/TSA remained to use cue strategy, indicating that striatal PKA/CREB hyperactivity blocked the TSA-induced shift toward the use of a place strategy. These findings suggest that post-training intra-CA1 histone hyperacetylation promotes dynamic shift from predominantly cue to more place learning; this, however, requires accurate regulation of CREB function within the hippocampus and striatum.

Our current findings indicate that enhancing histone acetylation into the dorsal CA1 at the time of early consolidation process is a positive factor facilitating the switch from predominantly striatum-based cue to hippocampus-based place strategy in young mice. These findings and recent reports converge to suggest that both histone H4 and CREB are critical components of

## Dagnas et al. Histone Acetylation and Memory

the mechanism by which HDACi enhances hippocampusdependent memories. Although molecular details on how H4 and CREB interact to regulate memory formation remain to be elucidated, these results may have important therapeutic implications in view of the efforts to design new drugs to target cognitive disorders resulting from normal and pathological aging.

#### References

- Baudonnat M, Guillou JL, Husson M, Vandesquille M, Corio M, Decorte L, Faugère A, Porte Y, Mons N, David V (2011) Disrupting effect of druginduced reward on spatial but not cue-guided learning: implication of the striatal protein kinase A/cAMP response element-binding protein pathway. J Neurosci 31:16517–16528.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/ cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 94:7041–7046.
- Blanchard J, Martel G, Guillou JL, Noguès X, Micheau J (2008) Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cueguided response. Neurobiol Aging 29:1011–1021.
- 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 acetylationdependent transcriptional events in the rat hippocampus. Neuropsychopharmacology 35:2521–2537.
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR (2012) Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. PLoS One 7:e33249.
- 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.
- Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA (2003) Cognitive strategyspecific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci 23:3547–3554.
- Dash PK, Orsi SA, Moore AN (2009) Histone deactylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. Neuroscience 163:1–8.
- Federman N, Fustiñana MS, Romano A (2009) Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn Mem 16:600–606.
- 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.
- Fischer A, Sananbenesi F, Mungenast A, Tsai LH (2010) Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. Trends Pharmacol Sci 31:605–617.
- Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM (2008) Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. Mol Cell Neurosci 39:193–201.
- Francis YI, Fà 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.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic.
- Giralt A, Puigdellívol M, Carretón O, Paoletti P, Valero J, Parra-Damas A, Saura CA, Alberch J, Ginés S (2012) Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. Hum Mol Genet 21:1203–1216.
- Haettig J, Stefanko DP, Multani ML, Figueroa DX, McQuown SC, Wood MA (2011) HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent longterm memory for object location in a CBP-dependent manner. Learn Mem 18:71–79.

### J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX • 9

- Haggarty SJ, Tsai LH (2011) Probing the role of HDACs and mechanisms of chromatin-mediated neuroplasticity. Neurobiol Learn Mem 96:41–52.
- Hawk JD, Florian C, Abel T (2011) Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. Learn Mem 18:367–370.
- 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.
- Lattal KM, Barrett RM, Wood MA (2007) Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. Behav Neurosci 121:1125–1131.
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C (2008) A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. Proc Natl Acad Sci U S A 105:17163–17168.
- 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.
- Martel G, Millard A, Jaffard R, Guillou JL (2006) Stimulation of hippocampal adenylyl cyclase activity dissociates memory consolidation processes for response and place learning. Learn Mem 13:342–348.
- Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL (2007) Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience 150:743–753.
- Nicolle MM, Prescott S, Bizon JL (2003) Emergence of a cue strategy preference on the water maze task in aged C57B6 × SJL F1 hybrid mice. Learn Mem 10:520–524.
- Peixoto L, Abel T (2013) The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. Neuropsychopharmacology 38:62–76.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. Science 328:753–756.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampusdependent spatial memory. Neuron 34:447–462.
- Porte Y, Buhot MC, Mons N (2008a) Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiol Aging 29:1533–1546.
- Porte Y, Buhot MC, Mons NE (2008b) Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem 15:885–894.
- Porte Y, Trifilieff P, Wolff M, Micheau J, Buhot MC, Mons N (2011) Extinction of spatial memory alters CREB phosphorylation in hippocampal CA1, Hippocampus 21:1169–1179.
- Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS, Arnsten AF (2003) Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. Neuron 40:835–845.
- Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schröder N, Wood MA, Roesler R (2011) Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. Behav Brain Res 221:329–332.
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Río J, García-Osta A (2009) Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. Neuropsychopharmacology 34:1721–1732.
- Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA (2010) Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. J Neurosci 30:5037–5046.
- Sharma SK (2010) Protein acetylation in synaptic plasticity and memory. Neurosci Biobehav Rev 34:1234–1240.
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012) Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. Biol Psychiatry 72:25–33.
- 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.

## 10 • J. Neurosci., Month XX, 2013 • 33(XX):XX-XX

- Stilling RM, Fischer A (2011) The role of histone acetylation in ageassociated memory impairment and Alzheimer's disease. Neurobiol Learn Mem 96:19–26.
- Sung JY, Goo JS, Lee DE, Jin DQ, Bizon JL, Gallagher M, Han JS (2008) Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. Learn Mem 15:183–188.
- Sweatt JD (2009) Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. Biol Psychiatry 65:191–197.
- Taylor JR, Birnbaum S, Ubriani R, Arnsten AF (1999) Activation of cAMPdependent protein kinase A in prefrontal cortex impairs working memory performance. J Neurosci 19:RC23.

## Dagnas et al. • Histone Acetylation and Memory

- Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ (2004) Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. J Neurosci 24:5603–5610.
- Tunur T, Dohanich GP, Schrader LA (2010) Pre-exposure to context affects learning strategy selection in mice. Learn Mem 17:328–331.Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. J Neurosci 27:6128–6140.
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW (2011) Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. J Neurosci 31:17800–17810.

# CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacétylases hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spatiale au cours du vieillissement

Article 3 : Post-training intra-CA1 infusion of Trichostatin A disrupts spatial memory in aged mice Dagnas M., Porte Y., Micheau J., Beracochéa D., Mons N. Chapitre III - Inhibition des HDACs et mémoire spatiale

# CHAPITRE III : Effet de l'inhibition des histones déacétylases hippocampiques sur la consolidation de la mémoire spatiale au cours du vieillissement

# A. Introduction

Nos travaux précédents étayent l'hypothèse selon laquelle les mécanismes d'acétylation des histones, au sein de l'hippocampe et du striatum, jouent un rôle clé dans la consolidation du type de mémoire sollicité et dans la sélection de la stratégie préférentiellement utilisée lors d'épreuves en piscine de Morris. L'autre hypothèse formulée à partir des travaux précédents est que la dérégulation des mécanismes d'acétylation des histones, dans l'hippocampe, est impliquée dans les déficits mnésiques associés au vieillissement normal. Les expériences réalisées par la suite ont consisté à tester l'effet de l'augmentation post-apprentissage du niveau d'acétylation des histones, par inhibition pharmacologique des HDACs hippocampiques, sur la consolidation de la mémoire spatiale à long terme et ce chez des souris jeunes et âgées.

Les résultats obtenus dans le chapitre I indiquent que les déficits de mémoire spatiale, observés chez les souris âgées, s'accompagnent d'une diminution de l'acétylation de H4 et, à l'inverse, d'une augmentation de l'acétylation de H3, dans la région CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe. Ces résultats corroborent des études récentes suggérant que les déficits mnésiques liés à l'âge pourraient résulter d'une dérégulation des mécanismes d'acétylation/déacétylation de certaines histones, conduisant à une altération de la transcription des gènes nécessaires à la plasticité et à la mémoire à long terme (Peleg *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011; Castellano *et al.*, 2012). Notamment, deux études récentes ont validé l'hypothèse selon laquelle la diminution d'acétylation de l'histone H4 dans l'hippocampe est impliquée dans les déficits de plasticité et de mémoire spatiale et contextuelle (Peleg *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011).

Cette série d'expérience s'inscrit dans le cadre de nombreuses recherches rapportant que l'injection systémique ou intra-cérébrale d'IHDACs, avant ou après l'apprentissage, en inhibant le processus de déacétylation des histones, améliore la mémoire de rongeurs jeunes dans différentes tâches faisant intervenir l'hippocampe (Pour revues, Haggarty et Tsai, 2011; Stilling et Fischer, 2011). Notamment, l'administration post-apprentissage d'IHDACs dans l'hippocampe facilite la consolidation de la mémoire en conditionnement de peur au contexte ainsi qu'en reconnaissance de localisation d'objet (Vecsey *et al.*, 2007; Roozendaal *et al.*, 2010; Hawk *et al.*, 2011). L'état d'acétylation/déacétylation des histones étant un processus réversible, il constitue une cible thérapeutique privilégiée permettant de contrer les dysfonctionnements mnésiques liés au vieillissement normal (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). Des travaux ont également montré l'effet bénéfique d'un traitement systémique avec des IHDACs sur les performances mnésiques de souris modèles de vieillissement accéléré (Fischer *et al.*, 2007; Fontan-Lozano *et al.*, 2008) ou de la maladie d'Alzheimer (Francis *et al.*, 2009; Kilgore *et al.*, 2010; Ricobaraza *et al.*, 2012). Toutefois, d'autres études ont permis de préciser que les IHDACs n'améliorent pas la mémoire lorsque l'interaction entre CREB et CBP n'est pas fonctionnelle (Chwang *et al.*, 2007; Vecsey *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Haettig *et al.*, 2011).

Il est également important de souligner que la plupart des expériences testant l'effet des IHDACs sur la mémoire de rongeurs âgés ou modèles de pathologies neurodégénératives utilisent des traitements systémiques, parfois chroniques, et/ou intervenant avant les tests comportementaux. Dans cette série d'expériences, nous avons testé l'effet d'une injection intra-hippocampique de TSA, réalisée immédiatement après un apprentissage spatial massé en piscine de Morris d'une part, sur la rétention à long terme des informations spatiales de souris jeunes et âgées et d'autre part, sur les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 quantifiés dans le CA1 hippocampique à trois délais post-apprentissage. Partant de l'observation qu'un déficit d'activation de CREB hippocampique pourrait contribuer aux déficits de mémoire spatiale observés chez les souris âgées (Porte *et al.*, 2008a), nous avons également comparé les effets de l'injection intra-hippocampique de TSA sur les niveaux de phosphorylation de CREB de souris jeunes et âgées.

# B. Méthodologie

Des souris C57BL/6 jeunes (3-4 mois) et âgées (18-20 mois) ont réalisé une épreuve de navigation spatiale en piscine de Morris. Le protocole expérimental est strictement identique à celui précédemment décrit dans le chapitre I (localisation d'une plateforme immergée toujours située au même emplacement, suivant une procédure massée comprenant

quatre blocs de trois essais). Immédiatement après la fin de l'apprentissage, les deux groupes de souris ont reçu une injection intra-CA1 de TSA (groupes *Young-TSA* et *Aged-TSA*) ou de son solvant (groupes *Young-Veh* et *Aged-Veh*). L'effet de l'injection post-apprentissage de TSA sur les performances spatiales a été évalué, sur la moitié des animaux, grâce à un test de rétention effectué 24h plus tard. Lors de ce test, la plateforme est retirée de la piscine et la force de rappel de sa localisation est mesurée, en évaluant la persévérance des quatre groupes de souris à chercher dans la zone cible. Afin d'effectuer l'analyse immunohistochimique des niveaux d'acétylation des histones et de phosphorylation de CREB, l'autre moitié des animaux a été sacrifiée une heure, trois heures ou 24h après l'apprentissage. Leurs niveaux de H3 et H4 acétylées ainsi que de CREB phosphorylé dans le CA1 hippocampique ont été comparés à ceux de souris naïves n'ayant reçu aucun apprentissage (Figure 22).



**Figure 22 : Plan expérimental utilisé dans le chapitre III.** *Young-Veh* et *Aged-Veh* : souris jeunes et âgées ayant reçu une injection intra-hippocampique de solvant. *Young-TSA* et *Aged-TSA* : souris ayant reçu la Trichostatine A (TSA). Ac-H3 et Ac-H4 : histones H3 et H4 acétylées ; P-CREB : CREB phosphorylé.

# C. Principaux résultats et conclusions

(1) L'administration intra-hippocampique de TSA post-apprentissage n'a aucun effet sur les performances spatiales des souris jeunes, évaluées lors du test rétention, alors que celles des souris âgées sont fortement affectées par la TSA. Ainsi, on peut noter que tous les groupes, excepté le groupe de souris âgées ayant reçu la TSA, présentent une préférence pour la zone de plateforme cible par rapport aux trois zones équivalentes situées dans les autres quadrants.

(2) Les données d'imagerie concernant les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 dans le CA1 des groupes témoins (*Young-Veh* et *Aged-Veh*) confirment nos résultats des précédentes expériences (chapitre I). Ainsi, la comparaison des groupes ayant reçu le solvant indique que **l'âge diminue les niveaux d'acétylation de H4 mesurés** une heure et trois heures après l'apprentissage alors qu'il induit **une augmentation du niveau d'acétylation de H3 au délai de sacrifice d'une heure**. L'administration intra-hippocampique de **TSA augmente fortement les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 dans le CA1** des souris jeunes et âgées aux délais d'une heure et trois heures. Cependant, au délai d'une heure, **l'acétylation de H3 reste plus élevée chez les souris âgées** que chez les souris jeunes. Ainsi, l'administration intra-hippocampique de TSA est capable de contrecarrer l'hypoacétylation de H4 mais ne normalise pas l'acétylation de H3 dans le CA1 des souris âgées.

(3) L'analyse immunohistochimique de l'activation/phosphorylation de CREB dans le CA1 des souris jeunes révèle une augmentation des niveaux de CREB phosphorylé aux délais d'une heure et trois heures après l'apprentissage, sans effet du traitement. Par ailleurs, la TSA n'atténue pas le déficit d'activation de CREB hippocampique lié à l'âge.

Nous montrons, de manière inattendue, qu'après une injection intra-hippocampique de TSA durant la phase de consolidation, les performances mnésiques soit demeurent inchangées (souris jeunes), soit sont fortement perturbées (souris âgées), lors du test de rétention effectué 24h après l'apprentissage spatial. Ainsi, ces résultats divergent de ceux de la littérature rapportant l'effet bénéfique d'injections d'IHDACs en post-apprentissage sur la mémoire à long terme, dans des tâches hippocampo-dépendantes comme le conditionnement de peur au contexte (Vecsey *et al.*, 2007) ou la reconnaissance de localisation d'objet (Stefanko *et al.*, 2009; Roozendaal *et al.*, 2010; Hawk *et al.*, 2011). Toutefois, une étude récente révèle que le sodium butyrate injecté immédiatement après l'apprentissage d'une tâche de reconnaissance d'objet n'a pas d'influence sur les performances de rats jeunes (Reolon *et al.*, 2011). L'origine de telles différences sur l'efficacité des IHDACs à améliorer la mémoire à long terme des animaux jeunes pourrait s'expliquer par l'atteinte d'un « niveau maximal » de performances par les animaux contrôles, dans notre étude comme dans celle de Reolon et *al.* (2011), ce qui masquerait l'effet de la TSA.

Nos résultats indiquent que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 observée dans l'hippocampe des souris âgées injectées avec la TSA perturbe fortement la rétention à long terme des informations spatiales. Nos données tranchent avec celles de la littérature rapportant que l'augmentation du niveau d'acétylation des histones après un traitement aigü aux IHDACs, administré avant ou après l'acquisition, améliore les performances des animaux âgés en conditionnement de peur au contexte ou en reconnaissance d'objet (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). Plusieurs arguments peuvent être avancés pour rendre compte des effets divergents d'une injection d'IHDACs sur la rétention mnésique d'animaux âgés. L'une des explications peut être la nature même de la tâche utilisée. En effet, dans l'épreuve spatiale en piscine de Morris, des études ont observé que des souris C57BL/6 âgées pouvaient compenser une hypoactivité de l'hippocampe par la mise en place de stratégies alternatives dépendant d'autres structures comme le striatum (Bach *et al.*, 1999; Fellini *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'injection locale de TSA dans l'hippocampe juste après l'apprentissage ne permettrait pas de contrer les perturbations de leurs performances mnésiques.

En accord avec les travaux de la littérature (Peleg *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011) et nos premiers résultats (chapitre I), nos données révèlent un défaut d'acétylation de H4 dans le CA1 des souris âgées consécutivement à l'apprentissage spatial, témoignant d'une hypoactivité de l'hippocampe. Cependant, la diminution de H4 acétylée est compensée par une hyperacétylation de H3 au délai d'une heure post-apprentissage. De plus, nous montrons que si l'administration locale de TSA rétablit les niveaux de H4 acétylée au niveau de ceux des jeunes, elle ne permet pas d'abolir l'hyperacétylation de H3 dans le CA1 des souris âgées. Une orchestration précise des mécanismes d'acétylation/déacétylation est nécessaire à la régulation optimale de l'expression génique. On peut alors supposer que **la forte augmentation du niveau d'acétylation des histones par la TSA chez les souris âgées pourrait induire une transcription aberrante de gènes dans le CA1, plus spécifiquement de ceux régulés par l'acétylation de H3 et contribuer aux effets délétères de la TSA sur la mémoire spatiale.** 

Enfin, la TSA, injectée dans le CA1, ne permet pas de rétablir les niveaux de CREB phosphorylé chez les souris âgées. Or, de nombreuses études mettent en évidence **le rôle clé de l'interaction entre CBP et CREB pour l'amélioration des performances mnésiques par l'administration d'IHDACs.** En effet, l'injection de TSA est inefficace chez des souris dont l'interaction entre CREB et CBP est impossible ou chez des souris *Knock-Out* pour MSK1, chez lesquelles l'activation de CREB est fortement diminuée (Chwang *et al.*, 2007; Vecsey *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). Ainsi, la phosphorylation de CREB pourrait agir comme un facteur limitant et le fait d'augmenter l'acétylation des histones en maintenant la disponibilité de CREB phosphorylé restreinte pourrait également contribuer aux effets délétères de la TSA observés chez les individus âgés.

En conclusion, nos données sont les premières montrant que la TSA, injectée dans le CA1 immédiatement après l'apprentissage, perturbe largement les performances des souris âgées lors du test de rétention à 24h. Nos résultats suggèrent qu'une dérégulation de la balance entre l'acétylation de H3 et de H4, associée à une forte perturbation de l'activation de CREB dans le CA1 des souris âgées pourrait contribuer à cet effet délétère de la TSA. Ces travaux apportent des informations importantes quant aux perspectives thérapeutiques envisageant les IHDACs comme candidats pour l'amélioration des performances mnésiques dans le cas du vieillissement normal ou pathologique.

# Post-training intra-CA1 infusion of Trichostatin A disrupts spatial memory in aged mice

M. Dagnas, Y. Porte, J. Micheau, D. Beracochea and N. Mons\*

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.

\*Corresponding Author. Tel: +33 540 00 24 60; Fax: 33 540 00 87 43. *E-mail address:* nicole.mons@ u-bordeaux1.fr

Number of Figures: 5

Number of Pages: 25

Abstract: 171 words; Introduction: 456 words; Discussion: 1572 words

*Keywords*: Spatial Memory, Trichostatin A, Aging, Histone deacetylase, Epigenetics, Hippocampus, Water maze.

# ABSTRACT

Using a one-day massed spatial learning task in the water maze, we investigated the effects of immediate post-training histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) infusion into the dorsal CA1 region on hippocampus-dependent spatial memory formation in young and aged mice. We also examined learning-dependent changes in histone H3 and H4 acetylation and CREB phosphorylation in the CA1 in relation to age and TSA treatment. Surprisingly, aged mice infused with TSA demonstrated spatial memory impairments during the 24 h-probe test, compared with age-matched vehicle controls and young mice infused with TSA or vehicle. After learning, aged mice displayed increased H3 acetylation but reduced H4 acetylation and CREB phosphorylation compared with young animals. TSA treatment fully rescued H4 acetylation but did not attenuate the age-associated increase in H3 acetylation. In addition, altered CREB function was maintained in TSA-infused aged mice. The present findings suggest that an imbalance in histone acetylation and a disruption of CREB function in aged mice are both key mechanisms contributing to the detrimental effects of TSA on spatial memory.

# 1. Introduction

Acting in several brain regions, acetylation at multiple lysine residues on the Nterminal tail of histone proteins serves as a critical epigenetic mark that influences transcription of plasticity/memory-related genes by increasing DNA accessibility to the transcription machinery (for review, Day and Sweatt, 2011). Acetylation of histones, in particular H3 and H4, is involved in hippocampal synaptic plasticity and hippocampusdependent long-term memory processes (Bousiges et al., 2010; Chwang et al., 2006; Levenson et al., 2004; Lubin et al., 2008; Miller et al., 2008; Peleg et al., 2010; Reul et al., 2009). Increasing histone acetylation via non-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACi), such as sodium butyrate or Trichostatin A (TSA), administrated prior to training enhances learning abilities and promotes the retrieval of long-term memory in numerous hippocampus-dependent tasks, including spatial learning (Dash et al., 2009; Fischer et al., 2007; Ricobaraza et al., 2009) and contextual associative fear conditioning (Fischer et al., 2007; Kilgore et al., 2010; Lattal et al., 2007; Levenson et al., 2004). In a recent study, acute administration of the HDACi, SAHA, prior to training, was able to rescue learning-induced H4 acetylation (H4K12) in aged mice and reinstate hippocampus-dependent (contextual fear) memory (Peleg et al., 2010). In the few studies using post-training administration of HDACi, systemic or acute infusion of TSA facilitates or enhances long-term memory formation in crabs (Federman et al., 2009) and rodents (Haettig et al., 2011; Hawk et al., 2011; Roozendaal et al., 2010; Stafford et al., 2012; Vecsey et al., 2007). On the other hand, studies have reported that enhancing histone acetylation prior to or after a learning experience has no effect on memory in wild-type mice (Kilgore et al., 2010) or fails to enhance memory in mice lacking CREB binding protein (CBP, Chen et al., 2010; Haettig et al., 2011) or mice with impaired CREB function (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007). Based on these observations, it was proposed that HDAC inhibition-induced enhancement of hippocampusdependent memory consolidation entirely depends on CBP and its interaction with the transcription factor CREB.

Focusing on the potential involvement of CREB-mediated transcription in hippocampus-dependent memory consolidation, we previously demonstrated that disrupted CREB phosphorylation in the dorsal CA1 region correlates closely with spatial memory impairments in aged mice (Porte et al., 2008a). In the present study, we sought to determine whether immediate post-training HDACi administrated into the CA1 of the dorsal hippocampus differentially influences long-term consolidation of spatial memory in young and aged C57BL/6 mice using a massed spatial task procedure in the water maze. We also analyzed the effects of post-training TSA infusion on dynamic regulation of histone H3 and H4 acetylation and CREB phosphorylation in the dorsal CA1 region of young and aged mice.

# 2. Materials and methods

## 2.1. Subjects.

Male C57BL/6 mice at 3-4 (n = 58) and 18-20 month (n = 49) old were housed individually in a temperature-controlled colony room ( $22 \pm 1^{\circ}$ C) under a 12:12 h light-dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. Mice were habituated to handling for seven days prior to training. All procedures were consistent with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

# 2.2. Experimental design.

Immediately after the last training trial, young and aged mice were divided randomly into two groups to receive intra-CA1 infusions of either TSA or vehicle. Each group of mice was then divided in two cohorts. The first cohort was tested for memory retention on a probe test given 24 h after training (Young-TSA: n = 12; Aged-TSA: n = 7; Young-Veh: n = 11, Aged-Veh: n = 7). The remaining mice were sacrificed at different delays after training together with naive home-cage controls for immunohistochemistry (Young-TSA: n = 16; Aged-TSA: n = 15; Young-Veh: n = 14, Aged-Veh: n = 15; Young-naive: n = 5; Aged-naive: n = 5) (Fig. 1A).

# 2.3. Surgery.

Mice were anesthetized with ketamine (100 mg / Kg; body weight, i.p.) and xylasine (6 mg / kg; body weight, i.p.) (Bayer, Wuppertal, Germany) and secured in a stereotaxic apparatus (Kopf instruments). Stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the dorsal hippocampus (anteroposterior - 2 mm; mediolateral  $\pm$  1.4 mm; dorsoventral 0.9 mm; relative to dura and bregma). The coordinates were determined on the atlas of Franklin and Paxinos (1997). The guide cannulae were fixed

with dental cement and three jewel screws attached to the skull. Mice were allowed to recover in their home cage for a minimum of 10 days before behavioral experiments.

# 2.4. Drug infusion.

The HDACi TSA (2.5  $\mu$ g /  $\mu$ L; TOCRIS BIOSCIENCE) was dissolved in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) in artificial cerebrospinal fluid (Vehicle) and infused into the dorsal hippocampal area CA1 immediately after spatial training. Bilateral infusion of either TSA or vehicle took ~ 5 min (0.1  $\mu$ L / min each site). The cannulae were left in place for an additional 1 min before removal to allow diffusion of the drug away from the cannulae tips.

# 2.5. Behavioral procedure.

Mice were trained in a Morris water maze learning protocol to evaluate the learning abilities of the aged animals on a spatial memory task.

# 2.5.1. Pretraining.

Mice were given three consecutive trials in order to acquire the procedural aspects of the task and for controlling motor and visual capacities. The session started with the animal standing on the hidden platform (PF) for 60 s. Each trial consisted in releasing the mouse into the pool facing the wall at one of the three variable starting points. The mouse was allowed to search for the PF for 60 s, then remained on the PF for 60 s and returned to its home cage. If the mouse failed to escape, it was gently guided by hand to the PF until it was able to escape without help.

# 2.5.2. Procedure.

Twenty four hours later, mice received spatial training in a water maze located in another testing room. The 1-day massed training protocol consisted of 4 consecutive blocks of

3 trials per block with an inter-block interval of ~ 20 min. A trial began by placing mice into the pool facing the side wall in one of three starting locations (nominally NE, SW and SE, with PF in NW; chosen pseudo-randomly across trials). Mice were allowed to swim for 90 s to locate the PF, otherwise they were guided to the PF by the experimenter. Then, mice remained on the PF for 20 s before returning to their home cage until next trial (inter-trial interval ~10 min). Twenty four hours later, spatial memory retention was assessed in a probe test during which the escape PF was removed from the pool and the mouse allowed to search for 90 s.

# 2.5.3. Data recording.

Behavioral data from the training and probe test were acquired and analyzed using an automated tracking system (Videotrack, Viewpoint, France) as previously described (Porte et al., 2008a; Porte et al., 2008b; Porte et al., 2011). For the training data, we analyzed the mean path length (in cm) to escape from the releasing point to the submerged PF. In the probe test, spatial memory retention was assessed by measuring the percentage of total swimming distance, the percentage of total time and the number of entries into the target PF zone (centered on the location of the PF during training, 1% of the pool surface) *vs* the three other equivalent and equally sized PF zones symmetrically located in the other quadrants of the pool.

# 2.6. Immunohistochemistry.

The learning-related changes in histone acetylation were examined in TSA and vehicle-infused mice sacrificed 1 h, 3 h or 24 h after the last training trial. Briefly, mice were anesthetized using Avertin (10 ml / Kg, i.p.) and perfused transcardially with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were removed, stored overnight in

the same fixation solution, sectioned (50 µm) on a vibratome (Leica) and kept in a solution containing 30% ethylene glycol, 30% glycerol, 0.1 M PB at - 20°C until processed for immunohistochemistry as previously described (Porte et al., 2011). Sections were incubated antibodies with rabbit primary polyclonal anti-acetyl(lys14)H3 (1:1000),antiacetyl(lys5,8,12,16)H4 (1:4000) or anti-phospho(ser133)-CREB (1:4000) (all from Upstate Biotechnology, Lake placid, NY), then with a biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:2000, Jackson Immunoresearch) followed by an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). The peroxidase reaction was visualized by using diaminobenzidine tetrahydrochloride and hydrogen peroxide. Sections were mounted on gelatine-coated slides, dehydrated and coverslipped. All images were acquired using an Olympus (BX50) through a 20X objective and digitized using an imaging analysis system (Biocom Visiolab 2000, V4.50). At least three serial sections for each animal were analyzed bilaterally and the average number of immunopositive nuclei / mm<sup>2</sup> was quantified in the CA1 region of the dorsal hippocampus according to Franklin and Paxinos (1997).

For double-immunofluorescence detection, the above-mentioned protocol was used with some modifications. Briefly, 35 µm thick sections were incubated with primary polyclonal rabbit antibody against phospho(ser133)-CREB (1:1000, Upstate Biotechnology) and monoclonal mouse antibody anti-acetyl(lys5,8,12,16)H4 (1:1000, Euromedex). A goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 labelled (Invitrogen) and a goat anti-mouse Fluoprobe 488 labelled (Interchim), both diluted at 1:1000 were used as secondary antibodies. Sections were mounted with fluorescence mounting medium (Interchim) and fluorescence signals were visualized using a LEICA DM6000 imaging system.

# 2.7. Statistical analyses.

Statistical analyses were conducted using the statistical software Statview 5.01 (SAS Institute Inc.). Group means  $\pm$  SEM were calculated and data were analyzed using one- or two-way analysis of variance (ANOVA), except for the data from the learning acquisition sessions which were analyzed by three-way repeated-measures ANOVA. Post-hoc analyses of significant main effects were further examined using Fisher's PLSD tests. In all analyses, values of P < 0.05 were considered as statistically significant.

# 3. Results

## 3.1. Age-dependent effects of post-training intra-CA1 infusion of TSA on spatial memory.

# 3.1.1. Acquisition session.

Two cohorts of mice, one at 3-4 months and the other at 18-20 months, were trained in a 1-day massed spatial task in the water maze. Fig. 1B shows acquisition of the hidden PF location by each group during the 3-trial training blocks. Three-way repeated measures ANOVA on path lengths taken to reach the PF revealed significant effects of Block ( $F_{(3,288)}$  = 54.24; P < 0.0001) and Trial ( $F_{(2,192)} = 3.34$ ; P < 0.05) but no Block X Trial interaction ( $F_{(6,576)}$ ) = 1.67; P > 0.1). There was also a main effect of Age ( $F_{(1.96)}$  = 11.61; P < 0.001) but, importantly, no Age X Block, Age X Trial or Age X Trial X Block interaction (all F < 1; all P > 0.1), indicating that performance across the three training trials within a block did not differ between groups. Thus, both young and aged mice acquired the task during training (Block effect, Young:  $F_{(3,159)} = 31.18$ ; P < 0.0001; Aged:  $F_{(3,129)} = 24.57$ ; P < 0.0001; Fig. 1B). The Age difference seemed to be due to longer mean path length of aged mice relative to youngadults only on block B3 ( $F_{(1,97)} = 8.29$ ; P < 0.01) underlying mild delayed acquisition. Importantly, performance levels did not differ on Block B4 (P > 0.1), indicating that all the mice equally well learned to escape onto the hidden PF at the end of training. Swim speed was averaged over the 3-trial training blocks. A significant Age difference was observed between the two groups (young:  $15.85 \pm 2.82$  cm / s; aged:  $13.8 \pm 2.28$ ; P < 0.001) (data not shown).

# *3.1.2. Test trial at 24 h.*

Fig. 2 shows the effects of immediate post-training TSA infusion on several performance parameters during the 24 h-probe test in which the PF was removed from the

pool. To assess spatial memory retention for the target PF location, we compared the percentage of swimming distance (Fig. 2A), the percentage of time (Fig. 2B) and the number of entries (Fig. 2C) into the target PF zone relative to the three other PF zones. A two-way ANOVA yielded a significant main effect of Zone ( $F_{(3,132)} > 12$ ; P < 0.0001 for all parameters), no significant effect of Group (all P > 0.1) and a significant Group X Zone interaction ( $F_{(9,132)} = 3.25$ ; P < 0.01 for distance ;  $F_{(9,132)} = 2.40$ ; P < 0.01 for time;  $F_{(9,132)} =$ 2.48; P < 0.05 for entries). Specifically, young animals, regardless of whether they received TSA or not, showed a significant preference for the target PF zone (Veh:  $F_{(3,40)} > 8$ ; P < 0.001 and TSA:  $F_{(3,44)} > 10$ ; P < 0.001 for all parameters). In contrast, at the age of 18 months, only mice infused with vehicle preferred the target PF zone (Veh:  $F_{(3,24)} > 2.5$ ; P < 0.05 and TSA: F < 1; P > 0.05 for all parameters). ANOVAs specifically comparing performances in the target PF zone indicated no significant group difference for any of the parameters analyzed between TSA- and vehicle-infused young groups or between vehicle-infused aged mice and the two young groups (all P > 0.1 for distance, time and entries). The same analyses indicated that TSA-infused aged mice covered significantly less distance into the target PF zone and made significantly fewer PF crossings than vehicle or TSA-infused young mice (all P < 0.001) and vehicle-infused aged subjects (distance: P = 0.017; entries: P = 0.027). The TSA-infused aged-mice also spent less time swimming in the target PF zone than age-matched vehicle controls, but this difference did not reach statistical significance (P = 0.15). As illustrated in Fig. 2D, compared with other groups, the TSA-infused aged mice exhibited less preference for the target PF zone and swam preferentially in the PF zone located in the opposite quadrant. Importantly, the mean swimming speed during the probe test did not differ significantly between the vehicle and TSA-infused groups, thus indicating that motor activity was not impaired by direct infusion of TSA into the CA1 area (data not shown).

# 3.2. Effects of age on learning-related changes of histone H3 and H4 acetylation.

To address the relationship between spatial learning, histone acetylation and aging, we next examined the temporal patterns of H3 and H4 acetylation in the dorsal CA1 region of mice sacrificed 1 h, 3 h or 24 h after immediate post-training infusion of TSA or vehicle. When compared with matched home-cage controls, levels of acetylated histone H3 (Ac-H3) in vehicle-infused young mice were significantly enhanced at 1 h, peaked at 3 h and returned to control values by 24 h whereas in vehicle-infused aged mice, Ac-H3 levels peaked at 1 h, but then decreased at 3 h and returned to control levels by 24 h (Fig. 3A *left*). A two-way ANOVA on Ac-H3 data in the CA1 yielded a significant effect of Delay ( $F_{(3,31)} = 20.25$ ; P < 0.0001) but no significant effect of Age ( $F_{(1,31)} < 1$ ; P = 0.5). There was a significant Delay X Age interaction ( $F_{(3,31)} = 4.61$ ; P < 0.01) which was due to the fact that aged mice had significantly greater Ac-H3 levels than young mice at 1 h (P < 0.05) whereas the converse pattern was observed at 3 h post-training.

Figure 3B depicts another scenario for learning-related changes of Ac-H4 levels in young and aged mice. Vehicle-infused young subjects showed significant increases at 1-3 h, but not 24 h post-training time intervals whereas Ac-H4 level was weakly, but significantly, increased in the vehicle-infused aged mice at 3 h only (Fig. 3B *left*). A two-way ANOVA on Ac-H4 data yielded significant main effects of Delay ( $F_{(3,31)} = 8.82$ ; P < 0.001) and Age ( $F_{(1,31)} = 16.73$ ; P < 0.001) as well as a significant Delay X Age interaction ( $F_{(3,31)} = 7.99$ ; P < 0.001). Post-hoc analyses confirmed significant age differences at 1-3 h time intervals (P < 0.001 and P < 0.05, respectively).

# 3.3. Age-related effects of post-training TSA administration on histone H3 and H4 acetylation.

When compared with vehicle-infused groups, post-training infusion of TSA into the dorsal CA1 enhanced Ac-H3 and Ac-H4 at 1-3 h but not 24 h, in both young and aged mice

(Figs. 3A-B *right* and Fig. 4). A two-way ANOVA on Ac-H3 data revealed main effects of Treatment in groups of animals sacrificed at 1 h or 3 h post-training (both F > 50; P < 0.001). There was also a main Treatment X Age interaction for Ac-H3 data among the 1 h-groups ( $F_{(1,18)} = 5.71$ ; P < 0.05), with TSA-infused aged mice having greater Ac-H3 levels than corresponding vehicle controls (P < 0.0001) and TSA-infused young mice (P < 0.05). A two-way ANOVA on Ac-H4 data revealed significant effect of Treatment for both 1 h and 3 h-groups (both F > 29; P < 0.0001), but no Age nor Treatment X Age interaction (P > 0.1). Direct comparisons confirmed that CA1 Ac-H4 levels were also significantly greater in animals infused with TSA (*vs* vehicle: all P < 0.05) with no difference between the age groups (P = 0.87). Collectively, these observations suggested that immediate post-training TSA infusion into the CA1 increases learning-induced H3 and H4 acetylation in both age groups and rescues the age-associated deficit in H4 acetylation but does not attenuate the increase in H3 acetylation level produced by normal aging.

# 3.4. Age-related effects of post-training TSA administration on CREB phosphorylation.

Our previous findings showed that reduced CREB phosphorylation (referred to as P-CREB) in hippocampal CA1 is associated with aging-related spatial memory deficits in the water maze (Porte et al., 2008a). Thus, CREB phosphorylation might not be rescued by TSA treatment which would explain the observed TSA-induced memory impairments in aged mice. As depicted in Figure 5A, we compared age-related changes in CA1 P-CREB in TSAand vehicle-infused groups sacrificed 1-3 h after training. When compared with naive controls, levels of P-CREB in vehicle- and TSA-infused young mice were significantly enhanced at 1 h and 3 h after training whereas in aged mice, P-CREB levels did not differ from those of naive mice. Two-way ANOVA for P-CREB data yielded a significant effect of Age ( $F_{(1.38)} = 11.81$ ; P < 0.01), but no significant Treatment effect or Age X Treatment interaction (both  $F_{(1,38)} < 1$ ; P > 0.5). Indeed, all aged groups displayed significantly reduced P-CREB levels compared with their corresponding young-adults group (1 h-TSA or vehicle: both P < 0.001; 3 h-TSA or vehicle: both P < 0.05; Fig. 5A). Using immunofluorescence, we next compared P-CREB and Ac-H4 immunoreactivities in CA1 neurons of mice sacrificed 1 h after training. As shown in Fig. 5B, decreased P-CREB level occurred concurrently with reduced H4 acetylation in the CA1 neurons of aged mice.

# 4. Discussion

Using a 1-day massed spatial learning task in the water maze, we showed first that bilateral intra-CA1 infusion of TSA immediately post-training had no effect on long-term spatial memory in young mice but induced memory deficits in aged mice. We observed opposite effects of aging on learning-related histone H3 (increase) and H4 acetylation (decrease) in the dorsal CA1 region. Immediate post-training infusion of TSA into the CA1 induced learning-related increase of histone acetylation in both young and aged mice and restored H4 acetylation to normal level but did not abolish enhanced H3 acetylation in aged CA1 neurons. Meanwhile, we observed that post-training TSA infusion did not rescue altered CREB phosphorylation in the aged hippocampus. We propose that an imbalance in histone acetylation homeostasis and a disruption of CREB function in the dorsal CA1 region of aged mice are both key mechanisms contributing to detrimental effects of TSA on spatial memory.

Increased histone acetylation, particularly on H3 and H4, has been implicated in the formation of spatial memory in the water maze (Bousiges et al., 2010; Dash et al., 2009; Fischer et al., 2007; Ricobaraza et al., 2009). Elevating histone acetylation through administration of the HDAC class I/II inhibitors such as TSA and sodium butyrate facilitated hippocampal synaptic function as well as hippocampus-dependent long-term memory formation in rodents (Fischer et al., 2007; Fontan-Lozano et al., 2008; Francis et al., 2009; Giralt et al., 2011; Haettig et al., 2011; Hawk et al., 2011; Itzhak et al., 2012; Levenson et al., 2004; Roozendaal et al., 2010; Stafford et al., 2012; Vecsey et al., 2007). Deregulation of histone acetylation, in particular H4, in aged rodents or in animal models of Alzheimer's disease impaired synaptic plasticity and memory consolidation in the hippocampus, and treatments with HDACi given prior to training rescued these deficits (Francis et al., 2009; Kilgore et al., 2010; Peleg et al., 2010; Ricobaraza et al., 2009; Zeng et al., 2011). Immediate

post-training systemic TSA administration, by increasing histone acetylation at the time of early consolidation processes, also efficiently reversed aging-related object recognition memory declines in rats (Reolon et al., 2011). In contrast, we found that TSA administered immediately post-training into the CA1 of the dorsal hippocampus impairs long-term spatial memory in the water maze in aged mice compared with corresponding young subjects. In addition, we did not observe effect of post-training intra-CA1 TSA infusion on spatial performance in young mice. Specifically, in the 24 h-probe test, the young mice that received TSA or vehicle infusion as well as the aged mice infused with vehicle explored more the target PF zone than others whereas TSA-infused aged mice did not show such a preference. Thus, our behavioral data suggest that, under certain conditions, immediate post-training TSA infusion into the CA1 may interfere with the consolidation of hippocampus-dependent memory in aged animals. Regarding young animals, the absence of any effect of TSA on spatial memory retention in the water maze may stem from already nearly optimal performance (as evidenced by the good retention performance shown by vehicle-infused young mice). This is consonant with recent observations indicating that, when given immediately post-training, infusion of HDACi had no effect in young animals with normal memory retention for object recognition (Reolon et al., 2011). Thus, as suggested by Reolon et al. (2011), the failure of TSA to enhance spatial memory in young animals might reflect "a ceiling effect" that can prevent HDAC inhibition for further improving memory.

One possible explanation for the age-dependent effect of post-training TSA infusion on spatial memory might be related to differences in search strategy used between young and aged C57BL/6 mice in looking for the hidden PF in the Morris water maze. Accordingly, rodent studies showed that navigational tasks can be solved by using two parallel and independent memory systems that cooperate or compete for successful learning: the dorsal hippocampus, which is crucial for spatial/place strategy and flexible use of multiple
environmental cues, and the dorsal striatum, which supports non spatial response/cue strategy and allows formation of simple associations between a restricted number of environmental cues and behavioral responses (Blanchard et al., 2008; Colombo et al., 2003; Martel et al., 2007; Morris et al., 1982; O'Keefe and Nadel, 1978; Packard et al., 1989; Packard and McGaugh, 1996; White and McDonald, 2002). Studies showed that aged C57BL/6 mice are capable of effective spatial learning in the water maze but preferentially use a non spatial strategy over a spatial search strategy, compared with young-adults (Bach et al., 1999; Fellini et al., 2006; Nicolle et al., 2003). Although we reported no differences between vehicleinfused young and aged mice on retention performance during the 24 h-probe test, aged mice demonstrated slower acquisition of spatial learning, compensated only after the last block. Thus, it is tempting to speculate that the use of striatum-based non spatial strategies may balance and mask hippocampal dysfunction in the aged mice. Indeed, post-training TSA infusion, by inducing histone hyperacetylation and promoting gene expression in the CA1 during early consolidation processes, may interfere with mechanisms through which the striatum compensates for hippocampus dysfunction.

Important data from recent findings showed that an age-related deregulation of histone acetylation in the dorsal hippocampus and the resulting changes in learning-induced gene expression are involved in impaired memory consolidation for contextual fear conditioning and spatial learning in mice (Peleg et al., 2010) and rats (Bousiges et al., 2010; Castellano et al., 2012; Zeng et al., 2011). The present study adds to previous evidence by showing that vehicle-infused aged mice sacrificed 1-3 h after learning displayed reduced learning-related levels of H4 acetylation in the dorsal CA1 relative to young subjects. In contrast, H3 acetylation was first increased (at 1 h) but then decreased (at 3 h) in the CA1 of vehicle-infused aged mice relative to matched young-adults. Thus, aging affects both the direction and amplitude of learning-related changes in H3 and H4 acetylation in the dorsal CA1 region.

These data suggest that spatial memory processing in the hippocampus of aged rodents suffers from an imbalance between predominantly increased learning-related H4 acetylation in young adult mice towards an increased importance of H3 acetylation in the CA1. Here, we show that immediate post-training TSA infusion fully rescued the loss in H4 acetylation but failed to abolish the deregulation in H3 acetylation observed in the 1 h-vehicle-infused aged group. Together, our data suggest that an imbalance between histone H3 and H4 acetylation homeostasis in aged mice contributes to impaired expression of plasticity-related genes and cognitive decline. The importance of precise temporal dynamics of histone acetylation for correct plasticity/memory-related gene expression response is consistent with earlier works showing that HDACi including TSA can play a dual role as activator or repressor in the regulation of CREB-target gene expression (Adachi et al., 2009; Fass et al., 2003; Vecsey et al., 2007). Importantly, recent studies demonstrated that HDAC and associated corepressors are recruited as "molecular brake pads" to reset chromatin opening by counteracting histone acetylation carried out by HATs at actively transcribed genes (Fitzsimons and Scott, 2011; McQuown and Wood, 2011). One possibility for the TSA-induced memory impairment in aged mice is that inappropriate or excessive histone acetylation in transcribed regions can destabilize chromatin structure and induce aberrant initiation of transcription. However, in addition to deregulated histone acetylation, changes in other key molecules involved in transcription of plasticity/memory-regulated genes may also contribute to spatial memory impairments in TSA-infused aged mice. In this regard, the learning-induced CREB activation/phosphorylation was increased in the hippocampus in rats that used an allocentric, spatial strategy to solve a radial arm maze task, whereas P-CREB was increased in the striatum of rats that used an egocentric, response strategy (Colombo et al., 2003). In our study, we showed that (1) CA1 P-CREB levels are markedly reduced in concert with decreased H4 acetylation in vehicle-infused aged mice and (2) post-training TSA infusion prevents the decrease in H4 acetylation but does not counteract reduced CREB activity in aged animals. Thus, even though post-training TSA infusion induced histone hyperacetylation in the aged CA1, such actions may be insufficient to allow expression of plasticity/memory-related genes regulated by CREB. In support of this, HDACi, including TSA, enhanced hippocampus-dependent spatial, associative or object location memories in a CREB:CBP dependent manner (Chen et al., 2010; Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007). For example, increasing histone acetylation *via* intra-hippocampal TSA infusion in CREB<sup> $\alpha$ - $\delta$ -</sup> or MSK1 knockout-out mice in which CREB function was severely disrupted failed to alleviate deficits for contextual fear conditioning (Chwang et al., 2007; Vecsey et al., 2007). These data suggest that hippocampus-dependent spatial memory suffers from reduced CREB function in the aged CA1 neurons and, furthermore, highlight a pivotal role of hippocampal CREB in the enhancing effect of TSA on hippocampus-dependent memory.

In summary, the present findings provide evidence that intra-CA1 infusion of TSA immediately after water maze spatial learning has no effect on long-term retention of spatial memory in young mice, but impairs spatial memory formation in aged mice. Our present data provide arguments to the existence of a close interdependence between histone H3 and H4 acetylation states during hippocampus-dependent memory formation in both young-adult and aged mice. We propose that an imbalance between histone H3 and H4 acetylation homeostasis associated with reduced CREB function in the dorsal CA1 region are both key mechanisms contributing to the TSA-related spatial memory impairments in aged mice. The data, together with others, suggest that a proper functioning of CREB activity is necessary for enhancement of hippocampus-dependent memory *via* HDAC inhibition.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Bordeaux. We thank Gilles Courtand for help with immunofluorescence staining. We thank L. Decorte and A. Faugère for technical assistance and D. Panzeri, N. Argenta and J. Huard for animals care.

#### **Disclosure statement**

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Adachi, M., Autry, A.E., Covington, H.E., 3rd, Monteggia, L.M., 2009. MeCP2-mediated transcription repression in the basolateral amygdala may underlie heightened anxiety in a mouse model of Rett syndrome. J Neurosci. 29, 4218-27.
- Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., 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, 5280-5.
- Blanchard, J., Martel, G., Guillou, J.L., Nogues, X., Micheau, J., 2008. Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cue-guided response. Neurobiol Aging. 29, 1011-21.
- Bousiges, O., Vasconcelos, A.P., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.P., Cassel, J.C., Boutillier, A.L., 2010. Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels H2B/H4Acetylation-Dependent and Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. Neuropsychopharmacology.
- Castellano, J.F., Fletcher, B.R., Kelley-Bell, B., Kim, D.H., Gallagher, M., Rapp, P.R., 2012. Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. PLoS One. 7, e33249.
- Chen, G., Zou, X., Watanabe, H., van Deursen, J.M., Shen, J., 2010. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. J Neurosci. 30, 13066-77.

- Chwang, W.B., O'Riordan, K.J., Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2006. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. Learn Mem. 13, 322-8.
- Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D., 2007. The nuclear kinase mitogenand stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. J Neurosci. 27, 12732-42.
- Colombo, P.J., Brightwell, J.J., Countryman, R.A., 2003. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci. 23, 3547-54.
- Dash, P.K., Orsi, S.A., Moore, A.N., 2009. Histone deactylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. Neuroscience. 163, 1-8.
- Day, J.J., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron. 70, 813-29.
- Fass, D.M., Butler, J.E., Goodman, R.H., 2003. Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. J Biol Chem. 278, 43014-9.
- Federman, N., Fustinana, M.S., Romano, A., 2009. Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn Mem. 16, 600-6.
- Fellini, L., Schachner, M., Morellini, F., 2006. Adult but not aged C57BL/6 male mice are capable of using geometry for orientation. Learn Mem. 13, 473-81.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.H., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. Nature. 447, 178-82.
- Fitzsimons, H.L., Scott, M.J., 2011. Genetic modulation of Rpd3 expression impairs longterm courtship memory in Drosophila. PLoS One. 6, e29171.
- Fontan-Lozano, A., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Munera, A., Delgado-Garcia, J.M., Carrion, A.M., 2008. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in

young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. Mol Cell Neurosci. 39, 193-201.

- Francis, Y.I., Fa, M., Ashraf, H., Zhang, H., Staniszewski, A., Latchman, D.S., Arancio, O., 2009. Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 18, 131-9.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, C.
- Giralt, A., Puigdellivol, M., Carreton, O., Paoletti, P., Valero, J., Parra-Damas, A., Saura,C.A., Alberch, J., Gines, S., 2011. Long-term memory deficits in Huntington's diseaseare associated with reduced CBP histone acetylase activity. Hum Mol Genet.
- Haettig, J., Stefanko, D.P., Multani, M.L., Figueroa, D.X., McQuown, S.C., Wood, M.A.,2011. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. Learn Mem. 18, 71-9.
- Hawk, J.D., Florian, C., Abel, T., 2011. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. Learn Mem. 18, 367-70.
- Itzhak, Y., Anderson, K.L., Kelley, J.B., Petkov, M., 2012. Histone acetylation rescues contextual fear conditioning in nNOS KO mice and accelerates extinction of cued fear conditioning in wild type mice. Neurobiol Learn Mem. 97, 409-17.
- Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt, J.D., Rumbaugh,G., 2010. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficitsin a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology. 35, 870-80.
- Lattal, K.M., Barrett, R.M., Wood, M.A., 2007. Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. Behav Neurosci. 121, 1125-31.

- Levenson, J.M., O'Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D., 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. J Biol Chem. 279, 40545-59.
- Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. J Neurosci. 28, 10576-86.
- Martel, G., Blanchard, J., Mons, N., Gastambide, F., Micheau, J., Guillou, J.L., 2007.Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience. 150, 743-53.
- McQuown, S.C., Wood, M.A., 2011. HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. Neurobiol Learn Mem. 96, 27-34.
- Miller, C.A., Campbell, S.L., Sweatt, J.D., 2008. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. Neurobiol Learn Mem. 89, 599-603.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature. 297, 681-3.
- Nicolle, M.M., Prescott, S., Bizon, J.L., 2003. Emergence of a cue strategy preference on the water maze task in aged C57B6 x SJL F1 hybrid mice. Learn Mem. 10, 520-4.
- O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. The hippocampus as a cognitive map. Vol., ed.^eds. Oxford University Press, Oxford.
- Packard, M.G., Hirsh, R., White, N.M., 1989. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. J Neurosci. 9, 1465-72.
- Packard, M.G., McGaugh, J.L., 1996. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. Neurobiol Learn Mem. 65, 65-72.

- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., 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, 753-6.
- Porte, Y., Buhot, M.C., Mons, N., 2008a. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiol Aging. 29, 1533-46.
- Porte, Y., Buhot, M.C., Mons, N.E., 2008b. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem. 15, 885-94.
- Porte, Y., Trifilieff, P., Wolff, M., Micheau, J., Buhot, M.C., Mons, N., 2011. Extinction of spatial memory alters CREB phosphorylation in hippocampal CA1. Hippocampus. 21, 1169-79.
- Reolon, G.K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V.A., Schroder, N., Wood, M.A., Roesler, R., 2011. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. Behav Brain Res. 221, 329-32.
- Reul, J.M., Hesketh, S.A., Collins, A., Mecinas, M.G., 2009. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. Epigenetics. 4, 434-9.
- 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, 1721-32.

- Roozendaal, B., Hernandez, A., Cabrera, S.M., Hagewoud, R., Malvaez, M., Stefanko, D.P., Haettig, J., Wood, M.A., 2010. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. J Neurosci. 30, 5037-46.
- Stafford, J.M., Raybuck, J.D., Ryabinin, A.E., Lattal, K.M., 2012. Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. Biol Psychiatry. 72, 25-33.
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A., 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBPdependent transcriptional activation. J Neurosci. 27, 6128-40.
- White, N.M., McDonald, R.J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem. 77, 125-84.
- Zeng, Y., Tan, M., Kohyama, J., Sneddon, M., Watson, J.B., Sun, Y.E., Xie, C.W., 2011. Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. J Neurosci. 31, 17800-10.

### Figure 1



Figure 1. Age-related effects of post-training intra-CA1 administration of TSA on hippocampus-dependent spatial memory in the water maze. (A) Outline of the experimental design. Young and aged mice were subjected to a 1-day massed spatial task in the water maze. Immediately after training, they were randomly assigned to independent groups to receive bilateral infusion of TSA or vehicle into the dorsal CA1 region (arrows). Then, the four groups of mice were divided into two cohorts for behavioral and immunohistochemical analyses. (B) Acquisition of the hidden PF location during the 1-day massed spatial task in the water maze as expressed by mean path length (in cm) over the four consecutive blocks B1-B4 (3 trials / block). There was no difference in mean path length on block B4 indicating that both age groups efficiently learned the spatial task over training. Data are expressed as mean ± SEM values.



Figure 2

Figure 2. Post-training administration of TSA impairs long-term spatial memory in aged mice. Each mouse received a 90 s-probe test of spatial memory retention 24 h after the last training trial. (A-C) Percentage of distance (A), percentage of time (B) and number of crossings (entries; C) into the target platform (TARGET) zone compared with the three others PF zones (adjacent right and left: AR and AL; opposite: OPP). TSA-infused aged mice (Aged-TSA) exhibited significantly poorer retention of spatial memory than corresponding young group (Young-TSA) and vehicle-infused groups (Young-Veh and Aged-Veh). Bars represent mean + SEM.  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$  and  $^{\#\#}P < 0.001$ , target *vs* other zones.  $^{\circ}P < 0.05$ ;  $^{\circ\circ}P < 0.01$  and  $^{\circ\circ\circ}P < 0.001$ , *vs* target zone in TSA-infused aged mice. (D) Representative swimming paths during the probe test. The PF was located in NW during acquisition. In contrast to other groups, TSA-infused aged mice showed no spatial bias indicating impaired memory for the training location.





Figure 3. Age-dependent effects of post-training TSA infusion on learning-induced changes in H3 and H4 acetylation in the dorsal CA1 region. Young and aged mice were infused with TSA or vehicle immediately after the last training trial and sacrificed 1 h, 3 h or 24 h later for immunohistochemistry. (A) Levels of acetylated H3 (Ac-H3) in mice infused with vehicle *(left)* or TSA *(right)*. (B) Levels of acetylated H4 (Ac-H4) in mice infused with vehicle *(left)* or TSA *(right)*. Data are expressed as mean number of positive nuclei / mm<sup>2</sup> + SEM. <sup>#</sup>P < 0.05 and <sup>###</sup>P < 0.001, *vs* naive; <sup>\*</sup>P < 0.05 and <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001, *vs* young mice. <sup>o</sup>P < 0.05 and <sup>ooo</sup>P < 0.001, *vs* vehicle controls.

### Figure 4



**Figure 4. Enhanced histone acetylation in the CA1 region after post-training TSA infusion.** Representative photomicrographs of coronal sections through a 4X objective showing acetylated H3 (Ac-H3, *top*) and acetylated H4 (Ac-H4, *bottom*) immunoreactivities in young mice infused with TSA *(left)* and vehicle *(right)*. Scale bar: 700 µm.

Figure 5



Figure 5. Age-dependent effects of post-training TSA infusion on CREB phosphorylation (P-CREB) in the dorsal CA1 region. Young and aged mice were infused with TSA or vehicle immediately after the last training trial and sacrificed 1 h or 3 h later for immunohistochemistry. Data are expressed as mean number of positive nuclei /  $mm^2$  + SEM. <sup>#</sup>P < 0.05 and <sup>##</sup>P < 0.01, *vs* naive; <sup>\*</sup>P < 0.05 and <sup>\*\*\*</sup>P < 0.001, *vs* young mice. (B) Immunofluorescence stainings of acetylated H4 (Ac-H4, green) and P-CREB (red) in the CA1 neurons of vehicle-infused young and aged mice. A yellow colour indicates colocalisation in merged images.

Chapitre III - Inhibition des HDACs et mémoire spatiale

### **DISCUSSION GENERALE**

La consolidation à long terme de la mémoire repose sur des modifications fonctionnelles et structurales durables, permettant un remodelage des réseaux neuronaux activés lors de l'apprentissage. Les recherches menées ces dix dernières années convergent vers l'idée d'un rôle critique des mécanismes épigénétiques, notamment de l'acétylation des histones, dans l'expression de gènes qui sous-tendent la consolidation mnésique ainsi que le maintien à long terme de la plasticité (Pour revue, Graff et Mansuy, 2008).

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la majorité des travaux sur l'implication de l'acétylation des histones dans la formation de mémoires hippocampodépendantes utilise le paradigme de conditionnement de peur. Ces recherches ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe est régulée différemment selon la nature de l'apprentissage. Très recemment, des études ont fourni des informations importantes sur les relations existant entre la dérégulation des niveaux d'acétylation des histones et les déficits de mémoire ou de plasticité observés au cours du vieillissement normal ou pathologique (Pour revue, Stilling et Fischer, 2011). Des expériences ont également montré qu'une administration locale ou systémique d'IHDACs permet d'améliorer la mémoire d'animaux jeunes et de contrer les déficits mnésiques associés au vieillissement lors de tâches de conditionnement contextuel et de reconnaissance d'objet (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011).

Lorsque nous avons débuté les expériences, il existait peu de données concernant l'implication de l'acétylation des histones dans la formation de la mémoire spatiale ainsi que le rôle des dérégulations de l'acétylation des histones dans les déficits de mémoire spatiale associés au vieillissement (Bousiges *et al.*, 2010; Peleg *et al.*, 2010). Les travaux réalisés au cours de cette thèse reposent sur une approche comportementale, utilisant deux situations d'apprentissage (spatiale *versus* indicée) massé (chapitres I et III) en piscine de Morris ou un test de compétition, permettant de dissocier les stratégies spatiales et indicées (chapitre II). Cette approche, couplée à une approche pharmacologique (injection intra-hippocampique de TSA) et à de l'immunohistochimie, a permis d'établir l'implication de l'acétylation des histones H3 et H4 (et également de phosphorylation du facteur de transcription CREB), dans l'hippocampe et le striatum, selon le type de mémoire sollicité et/ou la nature des stratégies de navigation mises en œuvre. Cette approche pluridisciplinaire nous a également permis de caractériser les dérégulations de l'acétylation des histones H3 et H4 apparaissant au cours du vieillissement et pouvant contribuer aux déficits de mémoire spatiale observés chez des souris âgées.

Nos premières données ont permis de mettre en évidence un recrutement différentiel de l'acétylation des histones H3 et H4 au sein de l'hippocampe et du striatum selon la nature de la tâche (spatiale versus indicée) à consolider. Nous montrons également que les souris âgées présentent une altération de la mémoire spatiale associée à une dérégulation bidirectionnelle de l'acétylation des histones dans l'hippocampe suite à l'apprentissage spatial, qui se traduit par un large déficit de l'acétylation de l'histone H4 conjointe à une hyperacétylation de H3 dans le CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe.

La suite de nos travaux révèle que l'augmentation du niveau d'acétylation, par administration **intra-hippocampique de TSA** immédiatement après l'apprentissage, permet **de moduler les interactions entre systèmes de mémoire hippocampique et striatal**, en faveur de l'utilisation préférentielle d'une stratégie spatiale et au détriment de la sélection d'une stratégie indicée. Cependant, cet effet de la TSA est observable seulement chez des souris jeunes, les souris âgées dont la fonction hippocampique est altérée privilégiant une stratégie indicée indépendamment du traitement reçu.

Enfin, les travaux exposés dans le dernier chapitre montrent que l'injection intrahippocampique de **TSA**, administrée après l'apprentissage spatial, **ne permet pas d'améliorer les performances mnésiques des souris jeunes** et, de manière inattendue, produit un **effet délétère sur celles des souris âgées**. Nos données indiquent également que la TSA est capable de contrer les déficits d'acétylation de H4, mais ne normalise pas la phosphorylation de CREB dans l'hippocampe des souris âgées.

Dans leur ensemble, nos résultats viennent corroborer les données de la littérature suggérant que le profil d'acétylation des histones dans l'hippocampe, notamment dans la région CA1, est lié aux processus d'apprentissage et de mémorisation des représentations spatiale et contextuelle. De plus, notre étude se positionne en faveur de la nécessité de l'intégrité fonctionnelle de la cascade moléculaire aboutissant à l'activation de CREB pour l'effet bénéfique des IHDACs. Enfin, nos expériences offrent de nouvelles données remettant en cause la perspective de l'utilisation des IHDACs comme solution pharmacologique afin de contrer le déclin mnésique lié à l'âge.

### A. Le profil d'acétylation des histones est spécifique du type d'informations à consolider

Nos premiers résultats mettent en évidence une double dissociation relative aux profils d'acétylation des histones H3 et H4 dans le striatum dorsal et l'hippocampe des souris jeunes, suite à un apprentissage indicé ou spatial. Ainsi, l'apprentissage spatial induit une augmentation des niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 spécifiquement dans le CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe alors que l'apprentissage indicé s'accompagne d'une augmentation de l'acétylation des deux histones dans le striatum dorsal uniquement.

### A.1. La cartographie de l'acétylation des histones suite à un apprentissage indicé ou spatial confirme la double dissociation de la fonction du striatum et de l'hippocampe

De nombreuses données lésionnelles et pharmacologiques ont montré la nécessité de l'hippocampe pour l'établissement de cartes spatiales permettant de localiser une récompense dans un environnement invariant (Morris *et al.*, 1982; Packard *et al.*, 1989; Packard et McGaugh, 1992; Packard et Teather, 1997a; Schroeder *et al.*, 2002; Etchamendy *et al.*, 2003). Le striatum, quant à lui, intervient dans la mise en place d'automatismes, d'habiletés motrices ou de stratégies de guidage reposant sur l'association simple entre la récompense à localiser et un indice visuel placé près d'elle (Packard et Knowlton, 2002; Yin et Knowlton, 2006; Graybiel, 2008).

Une double dissociation de la contribution du striatum et de l'hippocampe dans la discrimination d'informations spatiales ou procédurales/indicées a été démontrée en piscine de Morris ou en soumettant des animaux à une situation ambigüe en labyrinthe en croix, permettant l'utilisation d'une stratégie spatiale ou d'une stratégie procédurale (Colombo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Sung *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, ces études utilisaient des approches lésionnelles, ou des marqueurs d'activité neuronale (CREB, gènes précoces). Par exemple, la formation de la mémoire spatiale induit l'activation du facteur de transcription CREB et l'expression des gènes précoces *fos* et *zif268* au sein de l'hippocampe alors qu'un apprentissage indicé/procédural entraine, quant à lui, une augmentation de CREB phosphorylé et de l'expression de la protéine Fos dans le striatum (Colombo *et al.*, 2003; Touzani *et al.*,

2003; Porte *et al.*, 2008b; Sung *et al.*, 2008; Porte *et al.*, 2011). Dans leur ensemble, ces études indiquent que l'activité de ces marqueurs dépend du degré d'implication de la structure examinée dans le traitement des informations à consolider. Cependant, lorsque nous avons commencé ces travaux, il n'existait aucune étude comparative permettant de déterminer comment les modifications d'acétylation des histones dans le striatum et l'hippocampe participent à la régulation de l'expression génique mise en jeu lors de la consolidation de ces deux types de tâches. Une seule étude avait montré que, contrairement à une augmentation spécifique de l'acétylation de H4 (et également de H2B), dans l'hippocampe lors de la consolidation de la mémoire spatiale, le niveau d'acétylation de H3 hippocampique était équivalent suite à l'apprentissage des deux types de tâches (Bousiges *et al.*, 2010). Dans notre étude, l'analyse par immunohistochimie des modifications d'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe et le striatum de souris jeunes sacrifiées une heure après l'apprentissage spatial ou indicé montre, pour la première fois, que l'activation différentielle des structures hippocampiques et striatales selon la nature de la tâche repose sur un recrutement sélectif des histones H3 et H4 dans ces structures.

### A.2. Le profil d'acétylation des histones dans l'hippocampe est spécifique de la nature des informations à consolider

En utilisant un autre paradigme comportemental, Levenson *et al.* (2004) ont montré qu'un conditionnement de peur au contexte induit spécifiquement l'augmentation de l'acétylation de H3 sur sa lysine 14, mais pas de H4, dans la région CA1 de rats. Au contraire, dans le paradigme d'inhibition latente, dans lequel les animaux sont pré-exposés au contexte durant deux heures avant de recevoir des chocs électriques, une augmentation d'acétylation de H4, mais pas de H3, est observée dans l'hippocampe, suggérant l'implication de H4 dans la mémorisation de tâches impliquant fortement l'hippocampe. Cette hypothèse est appuyée par Peleg *et al.* (2010), qui observent que l'hypoacétylation de l'histone H4 dans l'hippocampe de souris âgées est responsable des déficits de conditionnement de peur au contexte. Un recrutement de H4 acétylée sélectivement dans l'hippocampe, lors de la formation de la mémoire spatiale a également été confirmé par Bousiges *et al.* (2010). En accord avec ces données, nous montrons une augmentation de l'acétylation de H4 spécifiquement dans les régions CA1 et le gyrus denté des souris jeunes sacrifiées une heure après l'apprentissage spatial. Nos résultats révèlent également que les déficits de mémoire spatiale observés chez

les souris âgées sont associés à une forte diminution de l'acétylation de H4 dans ces deux régions, mais pas dans les autres structures cérébrales. Ainsi, d'après nos résultats et les données de la littérature, l'acétylation de **H4 dans l'hippocampe** semble jouer un rôle déterminant dans les mécanismes sous-tendant la consolidation de **mémoire (spatiale ou contextuelle) impliquant l'hippocampe**.

En revanche, l'implication de l'acétylation de H3 dans la formation de la mémoire spatiale en piscine de Morris reste incertaine puisque d'après Bousiges et al. (2010), l'augmentation de l'acétylation de H3 reflèterait le contexte environnemental dans lequel l'animal évolue plutôt que la mémoire spatiale en elle-même. D'autres données suggèrent que l'augmentation de H3 acétylée sur ses lysines 14 ou 9 au niveau de l'hippocampe témoigne d'une réponse élevée au stress et à la nouveauté. Par exemple, l'exposition à un stress (nage forcée, eau à température élevée, chocs électriques) ou à un nouvel environnement s'accompagne d'une augmentation de l'acétylation et de la phosphoacétylation de H3 dans l'hippocampe (Chandramohan et al., 2007; Reul et Chandramohan, 2007; Chandramohan et al., 2008; Sarantis et al., 2012). L'acétylation/phosphoacétylation de H3, induite par le stress au niveau de l'hippocampe, est dépendante de l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes ainsi que de la cascade ERK-MSK1-Elk-1 et contrôle l'expression de certains gènes cibles tels que fos, ou bdnf (Reul et al., 2009; Fuchikami et al., 2010; Gomez-Pinilla et al., 2011; Gutierrez-Mecinas et al., 2011; Mifsud et al., 2011). D'après ces différentes observations, l'augmentation d'acétylation de H3, observée dans le CA1 et le gyrus denté après l'apprentissage spatial, pourrait être induite par le stress de l'épreuve de navigation, plutôt que par l'apprentissage spatial en lui-même. Cependant, si tel était le cas, nous aurions dû observer après l'apprentissage indicé, une augmentation similaire de H3 acétylée au niveau de l'hippocampe. N'avant pas observé de tel changement, il semble que, dans notre cas, l'augmentation de l'acétylation de H3 au niveau de l'hippocampe participe aux mécanismes spécifiques de la consolidation de la mémoire spatiale. Il est important de noter que l'étude de Bousiges et al. (2010) est basée sur l'utilisation d'un anticorps reconnaissant H3 acétylée sur ses lysines 9 ou 14, alors que nous avons utilisé un anticorps dirigé contre H3 acétylé spécifiquement sur sa lysine 14. Ces données amènent à penser que, dans le cas d'une épreuve de navigation en piscine de Morris, l'acétylation de la lysine 9 pourrait être induite, de manière aspécifique, suite à différents types d'apprentissage et pourrait davantage être réactive à l'intégration du contexte environnemental. L'acétylation de H3 sur la lysine 14 serait, quant à elle, plus associée à la consolidation des informations spatiales.

Pour résumer, nous avons montré la spécificité de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe suite à un apprentissage spatial et dans le striatum suite à un apprentissage indicé. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle le profil d'acétylation des histones au sein de structures cérébrales distinctes pourrait refléter un encodage spécifique de différents types de mémoire. Nos résultats, ajoutés aux différents travaux de la littérature, suggèrent que l'acétylation de H4 au niveau de l'hippocampe joue un rôle spécifique dans les mécanismes moléculaires sous-tendant la mémorisation d'informations spatiales ou contextuelles. En revanche, sur la base de nos résultats et ceux de Bousiges *et al.* (2010), le lien existant l'acétylation de H3 dans l'hippocampe et la formation de la mémoire spatiale reste incertain. La recherche de l'implication des dérégulations de l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'établissement du déclin mnésique lié à l'âge permettrait alors de déterminer si des modifications d'acétylation de ces histones dans l'hippocampe sont essentielles à la formation de la mémoire spatiale.

### **B.** Les mécanismes d'acétylation des histones sont altérés au cours du vieillissement normal

Chez l'Homme, le vieillissement s'accompagne d'un déclin mnésique qui touche préférentiellement la mémoire déclarative et la mémoire de travail, en relation avec l'altération fonctionnelle des régions préfrontale et hippocampique. Les travaux menés chez le singe ou le rongeur rejoignent globalement ces observations. Les animaux présentent des déficits mnésiques dans des tâches spatiales ou relationnelles faisant intervenir l'hippocampe (Pour revue, Burke et Barnes, 2006). A l'inverse, la mémoire procédurale est préservée, notamment lors de tâches indicées en piscine de Morris (Magnusson, 1998; Frick et al., 2000; Frick et al., 2003; Krazem et al., 2003). Nos résultats comportementaux du chapitre I sont cohérents avec ces observations. Ils indiquent que les souris âgées présentent un déficit de mémoire spatiale, mais pas de mémoire indicée, lors du test de rétention à 24h, comparées à des souris jeunes-adultes. Cette étude révèle également que les altérations de mémoire spatiale liées à l'âge s'accompagnent de changements opposés de la régulation de l'acétylation des histones H3 et H4 spécifiquement dans le CA1 et le gyrus denté de l'hippocampe. Par ailleurs nous montrons, dans le chapitre III, que la phosphorylation de CREB, augmentée dans l'hippocampe après l'apprentissage spatial chez les jeunes, est également altérée chez les souris âgées présentant des déficits de mémoire spatiale.

## **B.1.** L'acétylation des histones est perturbée au cours du vieillissement

Les effets du vieillissement normal sur l'acétylation de l'histone H4, après un conditionnement de peur au contexte chez la souris, ont été récemment rapportés dans la littérature (Peleg et al., 2010). Globalement, ces travaux montrent que les déficits mnésiques liés à l'âge sont associés à une diminution de l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 spécifiquement dans l'hippocampe. Ce résultat, associé au fait que l'hypoacétylation de H4 produit une altération de l'expression de certains gènes impliqués dans la plasticité (Peleg et al., 2010), suggère qu'une diminution de l'acétylation de H4 au niveau de l'hippocampe, en particulier dans le CA1, serait impliquée dans la dérégulation de la machinerie transcriptionnelle conduisant, à terme, à des déficits de mémoires spatiale contextuelle. Cependant, dans une étude récente, une augmentation du niveau d'acétylation de H4 a été mise en évidence dans l'hippocampe de rats, en conditions basales et après une épreuve en piscine de Morris mixant essais spatiaux et indicés (Castellano et al., 2012). Comme Peleg et al. (2010), nous observons une hypoacétylation de H4 dans le CA1 et le gyrus denté des souris âgées sacrifiées une heure après l'apprentissage de la tâche spatiale (chapitres I et III) ou une heure après la séance d'acquisition du test de compétition (chapitre II). Nos résultats concordent également avec une autre étude montrant que l'altération de la PLT, chez des rats âgés, est associée à une perturbation de l'acétylation de H4 hippocampique sur son résidu lysine 12 (Zeng et al., 2011). Dans notre étude, la spécificité des effets de l'âge sur l'état d'acétylation de H4 dans l'hippocampe est confortée par l'absence de modifications significatives de l'acétylation de H4 dans l'hippocampe de souris âgées en condition indicée et, dans les autres structures, en condition spatiale comme indicée. Ainsi, l'hypoacétylation de H4 dans l'hippocampe de souris âgées pourrait être impliquée dans les dérégulations liées au vieillissement de l'expression de certains gènes cibles, comme c'est le cas pour fos lors d'apprentissage spatial en piscine de Morris ou en labyrinthe radiaire (Touzani et al., 2003; Porte et al., 2008a). L'hypoacétylation de H4 pourrait également contribuer à la diminution d'expression de bdnf et de arc, dans l'hippocampe de rats âgés soumis à un conditionnement de peur (Monti et al., 2005).

A ce jour, très peu d'études ont cherché si une dérégulation de l'acétylation de H3 est impliquée dans les déficits mnésiques associés au vieillissement normal. Peleg *et al.* (2010) ne trouvent aucune modification de l'acétylation de H3 sur les lysines 9 et 14 dans

l'hippocampe de souris âgées après un conditionnement de peur au contexte. Zeng et al. (2011), quant à eux, observent, en condition basale, une diminution de l'acétylation de H3 sur sa lysine 9 avec l'âge. Contrairement à ces études, nous montrons, une heure après l'acquisition de la tâche spatiale, une augmentation significative de l'acétylation de H3 sur sa lysine 14 dans l'hippocampe des souris âgées comparées aux jeunes contrôles. Cette hyperacétylation de H3 semble surprenante au regard des données de la littérature et pourrait traduire un mécanisme compensatoire visant à combler le défaut d'acétylation de H4. La différence entre nos données et celles de Peleg et al. (2010) qui, en examinant le même résidu lysine 14, ne montraient aucun effet de l'âge sur l'acétylation de l'histone H3, pourrait s'expliquer par la nature de la procédure utilisée. En effet, comme nous l'avons vu auparavant, une augmentation d'acétylation de H3 sur sa lysine 14 a souvent été rapportée suite à des procédures stressantes telles qu'un conditionnement au contexte (Levenson et al., 2004; Chwang et al., 2006), une épreuve de nage forcée, ou un stress de nouveauté (Bilang-Bleuel et al., 2005; Chandramohan et al., 2007; Reul et Chandramohan, 2007; Chandramohan et al., 2008). Notre paradigme de la piscine de Morris, notamment l'utilisation d'un apprentissage massé réalisé sur une seule séance peut s'avérer stressant pour les animaux âgés (Akirav et al., 2001; Harrison et al., 2009). Des études ont montré que la vulnérabilité au stress est accrue au cours du vieillissement (Stein-Behrens et Sapolsky, 1992) et que les niveaux de corticostérone plasmatique et hippocampique, basale ou en réponse au stress, sont plus élevés et durables chez les souris âgées, par rapport aux jeunes (Tronche et al., 2010). Il se peut donc que l'hyperacétylation de H3 dans l'hippocampe traduise une réponse exacerbée au stress causé par notre test comportemental chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes. Le conditionnement de peur au contexte, quant à lui, représente une épreuve très stressante pour les animaux qu'ils soient jeunes ou âgés. Ainsi, on peut supposer que, dans l'étude de Peleg et al. (2010) les niveaux d'acétylation de H3 sur sa lysine 14 atteignent un plateau chez les animaux jeunes suite à ce test, ce qui ne permettrait pas d'observer un effet de l'âge.

Pour résumer, nous observons qu'après apprentissage spatial, l'âge induit des changements opposés de l'acétylation des histones H3 (hyperacetylation) et H4 (hypoacétylation) dans le CA1 et le gyrus denté. De tels changements n'ont pas été observés dans le striatum après l'apprentissage spatial ou dans l'hippocampe après l'apprentissage indicé. Ces données suggèrent que l'effet de l'âge observé dans l'hippocampe est spécifique de la mémoire spatiale et n'est pas généralisable à toutes les structures ou à toutes les formes de mémoire mises en jeu.

206

### **B.2.** La balance HATs/HDACs serait altérée au cours du vieillissement

Les données concernant une possible dérégulation de la balance HATs/HDACs au cours du vieillissement sont contradictoires. Quelques travaux rapportent une augmentation de l'expression de certaines HDACs, notamment HDAC2, au cours du vieillissement. Par exemple, la perturbation de la PLT hippocampique chez les rats âgés est associé à une augmentation de l'expression de **HDAC2** (Zeng *et al.*, 2011). Cependant, Castellano *et al.* (2012) ne montrent aucun changement de l'expression de HDAC2 en condition basale ou suite à une épreuve en piscine de Morris.

La perte d'expression de CBP chez les individus âgés est également sujette à controverse. Ainsi, certaines études ne trouvent aucun effet de l'âge sur l'expression de CBP, ni sur sa fonction HAT en condition basale (Li *et al.*, 2002; Tomas Pereira *et al.*, 2012), contrairement à d'autres expériences, montrant une perte d'expression basale de CBP dans l'hippocampe et le néocortex de rats âgés (Chung *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2011). Dans notre étude, l'administration intra-hippocampique de TSA permet de rétablir l'acétylation des histones chez les souris âgées. Il semble donc que la balance HATs/HDACs reste fonctionnelle avec l'âge.

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les mécanismes d'acétylation sont étroitement liés à l'activation de facteurs de transcription. Notamment, CBP possède à la fois une fonction HAT et une fonction co-activatrice de la transcription, de par son interaction avec CREB. Parmi les nombreux mécanismes moléculaires altérés au cours du vieillissement, une diminution d'activation du facteur de transcription CREB est observée dans le CA1. Celle-ci est corrélée à des déficits de mémoire spatiale (Brightwell *et al.*, 2004; Porte *et al.*, 2008a). En accord avec ces données, nos résultats d'imagerie (chapitres II et III) indiquent une perturbation de la phosphorylation de CREB dans le CA1 des souris âgées, suite à un apprentissage spatial ou à la séance d'acquisition du test de compétition. Par ailleurs, la TSA n'atténue pas le déficit d'activation de CREB hippocampique lié à l'âge. Ainsi, l'effet délétère de la TSA sur la mémoire spatiale des souris âgées pourrait être la conséquence d'un recrutement aberrant de l'acétylation des histones associé à une perturbation de CREB dans l'hippocampe.

# **B.3.** Données préliminaires en faveur d'une dérégulation des interactions entre HATs, HDACs et CREB au cours du vieillissement

Partant de l'observation qu'un déficit d'activation de CREB hippocampique pourrait être à l'origine des déficits de mémoire spatiale observée chez les souris âgées (Porte *et al.*, 2008a), nous avons effectué une série d'expériences complémentaires portant sur l'analyse des effets (comportementaux et moléculaires) d'un traitement chronique au Rolipram chez les souris âgées. Le Rolipram, en inhibant la Phosphodiesterase 4, augmente l'activation de la voie AMPc/PKA/CREB et permet de contrer le déclin mnésique apparaissant chez des animaux âgés (Barad *et al.*, 1998; Bach *et al.*, 1999; de Lima *et al.*, 2008). Nous avons caractérisé les effets d'une injection systémique et chronique de Rolipram, d'une part sur la rétention à long terme de la mémoire spatiale des souris âgées, et d'autre part sur les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 et de phosphorylation de CREB, dans le CA1 hippocampique.

Pour cela, des souris âgées de 18-20 mois ont reçu quotidiennement une injection intrapéritonéale de Rolipram (0,2 mg/kg), ou de son solvant, durant 21 jours. Elles ont ensuite été soumises à un apprentissage spatial, selon le protocole décrit dans le chapitre I, puis à un test de rétention à 24h. Les résultats ne montrent aucun effet du Rolipram lors de la phase d'acquisition. Lors du test de rétention à 24h, l'analyse du temps passé à chercher dans une zone dite « large plateforme » (centrée sur la zone de plateforme cible mais de diamètre deux fois supérieur) indique que seules les souris traitées au Rolipram reconnaissent la zone cible par rapport aux autres zones (Figure 23A). Ceci confirme l'effet bénéfique du Rolipram sur les capacités mnésiques des animaux âgés. L'analyse immunohistochimique indique que l'administration de Rolipram rétablit le niveau de CREB phosphorylé et, de manière plus intéressante, celui de H4 acétylée, dans le CA1 hippocampique. En revanche, le traitement au Rolipram ne modifie pas le niveau d'acétylation de H3 (Figure 23B). Ces données suggèrent que l'augmentation conjointe des niveaux de CREB phosphorylé et de H4 acétylée permet le rétablissement des performances des animaux âgés dans la tâche spatiale. De plus, nos résultats amènent à penser que l'acétylation des histones H3 et H4 seraient régulées par des voies moléculaires différentes.



**Figure 23 : Un traitement chronique au Rolipram améliore les performances spatiales des souris âgées et augmentent les niveaux de H4 acétylée et de CREB phosphorylé.** Des souris âgées ont reçu une injection intrapéritonéale de Rolipram (Rol, 0,2 mg/kg) ou de son solvant (Solv) durant 21 jours puis ont été soumises à un apprentissage spatial en piscine de Morris. (A) Le temps passé à chercher dans une zone deux fois plus grande que la zone de plateforme et centrée sur cette dernière (LPF) a été examiné lors d'un test de rétention effectué 24h après l'apprentissage spatial. (B) Les souris ont été sacrifiées une heure après le test de rétention et leurs niveaux de H3 et H4 acétylées (Ac-H3, Ac-H4) ainsi que ceux de CREB phosphorylé (P-CREB) ont été quantifiés dans le CA1.

Les mécanismes par lesquels l'administration de Rolipram est capable d'augmenter le niveau d'acétylation de H4 ne sont pas identifiés. Cependant, des études montrent que la PKA est capable d'inhiber l'activité des HDAC5 et 8 (Lee *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2010). Ainsi, l'augmentation de l'activité de la PKA, par le traitement au Rolipram, pourrait accroitre directement le niveau d'acétylation par inhibition de ces HDACs. Il a également été montré que la protéine phosphatase PP1, qui déphosphoryle CREB, intéragit avec les HDACs 1, 6 et 8 (Canettieri *et al.*, 2003; Brush *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2009). Ainsi, il est possible que le Rolipram perturbe ce complexe **HDAC-PP1**, induisant à la fois une augmentation de l'activité de la PP1 survenant avec l'âge (Norris *et al.*, 1998), l'existence d'une telle interaction entre la PP1 et les HDACs pourrait contribuer à la dérégulation de l'activité de la PP1 pourrait entrainer une recrudescence de l'activité des HDACs. Étayant cet argument, l'inhibition sélective de la PP1 nucléaire dans les neurones du prosencéphale diminue l'activité des HDACs dans l'hippocampe, augmente l'acétylation de résidus

spécifiques des histones H2B, H3 et H4 et améliore la mémoire en reconnaissance d'objet (Koshibu *et al.*, 2009). Nos données indiquent qu'un traitement au Rolipram potentialise spécifiquement l'acétylation de l'histone H4 sans affecter celle de H3 dans le CA1 des souris âgées. Nous suggérons que les HDACs ciblant préférentiellement H4 soient capables de se lier à PP1 (par exemple HDACs 1, 6 et 8). Ainsi, l'augmentation de l'activité de ce complexe HDACs-PP1 au cours du vieillissement pourrait conduire à des perturbations de l'acétylation de H4, de la phosphorylation de CREB et à l'apparition d'altérations mnésiques.



**Figure 24 : Une hypothèse pour expliquer l'augmentation de l'acétylation de H4 par le Rolipram** (adapté de Canettieri *et al.*, 2003). La formation de complexes HDAC-PP1 à proximité de CREB inactive CREB et déacétyle les histones. L'augmentation de l'activité de la PKA permet d'augmenter la phosphorylation de CREB et pourrait perturber les complexes HDACs-PP1. Ceci conduirait à une augmentation conjointe de la phosphorylation de CREB et de l'acétylation de H4, permettant le maintien de la chromatine dans un état permissif pour la transcription de gènes.

En résumé, si le lien entre mémoire spatiale et acétylation de H3 reste incertain, l'acétylation de H4 apparait clairement impliquée dans la consolidation de mémoires hippocampo-dépendantes. De plus, l'acétylation de H4 sur certains résidus lysine spécifiques, en particulier sur sa lysine 12, semble affectée au cours du vieillissement. L'anticorps utilisé dans notre étude reconnaissant H4 acétylée sur ses lysines 5, 8, 12 ou 16, il apparait essentiel de confirmer cette hypothèse en caractérisant séparément, par immunohistochimie ou western blot, les variations d'acétylation de H4 sur ces différents résidus en fonction de l'âge, grâce à

des anticorps ciblant spécifiquement ces lysines acétylées. En outre, les différentes HATs et HDACs dont la fonction est affectée par le vieillissement ne sont pas encore clairement identifiées. Une suite logique à notre étude serait donc d'analyser, par des expériences de western blot, les niveaux d'activité des HATs (CBP et p300) et HDACs, chez des souris jeunes et âgées, en conditions basales et suite à l'apprentissage spatial en piscine de Morris. Il serait notamment intéressant d'étudier les niveaux d'expression de HDAC2 et des HDACs 1, 6 et 8, capables de se lier à PP1, afin de confirmer un possible lien entre l'augmentation de l'activité de la PP1 et des HDACs au cours du vieillissement. Enfin, les variations d'acétylation des histones H3 et H4 aux promoteurs de gènes cibles tels que *fos, bdnf* ou *arc*, qui sont impliqués dans les processus de mémorisation et dont l'expression est affectée par le vieillissement, pourrait être examinées par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine.

#### C. Les IHDACs comme perspective thérapeutique prometteuse ?

### C.1. Les IHDACs améliorent les performances mnésiques des animaux sains

Afin de mieux comprendre le rôle de l'acétylation des histones dans la mémorisation à long terme des informations spatiales, nous avons perturbé l'équilibre existant entre les HATs et les HDACs, en inhibant ces dernières par une injection intra-hippocampique d'un IHDACs, la TSA, au début de la phase de consolidation (chapitres II et III). L'administration d'IHDACs augmente l'amplitude et la durée de l'acétylation des histones, permettant ainsi une augmentation de l'activité transcriptionnelle nécessaire à la consolidation de la mémoire (Dokmanovic et Marks, 2005). Ainsi, un traitement aigu ou chronique, par voie systémique ou intra-hippocampique, aux IHDACs, tels que la TSA, le sodium butyrate ou le SAHA, avant l'apprentissage, induit une amélioration de la mémoire évaluée 24h après l'apprentissage dans des tâches de conditionnement de peur au contexte (Levenson *et al.*, 2004; Chwang *et al.*, 2007; Fass *et al.*, 2012) ou de reconnaissance d'objet (Fontan-Lozano *et al.*, 2008). Un effet facilitateur de l'injection post-acquisition d'IHDACs sur la réponse comportementale testée à 24h a également été rapporté dans ces mêmes tests (Vecsey *et al.*, 2007; Stefanko *et al.*, 2009; Roozendaal *et al.*, 2010; Haettig *et al.*, 2011; Hawk *et al.*, 2011).

Enfin, une étude réalisée chez le crabe indique que l'administration de sodium butyrate améliore la mémoire spatiale lorsqu'elle intervient soit avant, immédiatement ou six heures après l'apprentissage mais est inefficace si l'injection a lieu trois heures ou neuf heures après l'apprentissage (Federman *et al.*, 2009).

Dans nos conditions expérimentales, l'injection intra-hippocampique de TSA immédiatement après l'apprentissage, chez les souris jeunes, facilite la sélection d'une stratégie spatiale, au détriment de l'utilisation d'une stratégie indicée, lors du test de compétition effectué 24h après l'acquisition (chapitre II). Il est important de noter que cet effet facilitateur sur l'utilisation de la stratégie spatiale est observé seulement lorsque le test est effectué à 24h, mais ne modifie pas la stratégie utilisée à court terme, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Fontan-Lozano *et al.*, 2008; Stefanko *et al.*, 2009; McQuown *et al.*, 2011). Malgré cet effet bénéfique sur la consolidation des informations spatiales lors du test de compétition à 24h, l'administration de TSA n'a pas d'impact sur la rétention à long terme des informations dans la tâche spatiale (chapitre III). Cette différence d'effets de l'inhibition des HDACs, selon le type de tâche à réaliser, observée chez les souris jeunes, pourrait s'expliquer par l'intensité de l'apprentissage.

Des expériences, utilisant le paradigme comportemental de la reconnaissance d'objet, démontrent que l'administration de TSA ou de sodium butyrate permet la consolidation d'une trace mnésique dans des conditions expérimentales qui, normalement, ne conduisent pas à une mémorisation des informations à long terme. Dans ces études, le temps de présentation des objets, lors de la phase d'apprentissage, est relativement court. Lors de la phase de test, alors que des animaux témoins n'ont pas mémorisé les informations apprises, les souris ayant reçu l'IHDACs sont capables de discriminer entre l'objet déjà présenté et le nouvel objet (Fontan-Lozano et al., 2008; Stefanko et al., 2009; Haettig et al., 2011). Dans notre tâche de mémoire spatiale en condition massée (4 blocs de 3 essais), les performances des souris jeunes sont optimales dès le 3<sup>ème</sup> bloc d'essais d'acquisition et se maintiennent au même niveau lors du 4<sup>ème</sup> bloc. Nos conditions d'apprentissage étant « optimales », l'injection de TSA ne permettrait pas d'améliorer la réponse comportementale testée à 24h. Corroborant nos données, d'autres études ont également observé l'absence d'effet des IHDACs sur la mémoire à long terme de rongeurs jeunes et sains (Kilgore et al., 2010; Reolon et al., 2011). Il serait alors intéressant de tester l'effet de l'administration intra-hippocampique de TSA, chez des souris jeunes soumises à un nombre plus restreint d'essais d'apprentissage.

Lors du test de compétition, le niveau d'apprentissage est déterminant dans la sélection du (ou des) système(s) de mémoire adapté(s) à la tâche effectuée. Nous avons adapté

212

notre condition expérimentale (huit essais), de telle sorte que les souris jeunes sélectionnent une stratégie indicée reposant sur une coopération entre l'hippocampe et le striatum. En revanche, dans des conditions où l'apprentissage est maîtrisé (lorsque le nombre d'essais est d'environ 12), les souris utilisent préférentiellement une stratégie spatiale dépendante de l'hippocampe (Martel *et al.*, 2007). Ainsi, l'hyperacétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe, après **l'injection post-acquisition de TSA, facilite la sélection et l'utilisation de la stratégie spatiale lors du test de compétition à 24h, en modifiant les interactions entre les systèmes hippocampique et striatal.** 

#### C.2. Les IHDACs sont inefficaces chez les animaux âgés

Récemment, Peleg *et al.* (2010) ont montré que l'injection intra-hippocampique de sodium butyrate ou de SAHA, avant l'apprentissage, permet de rétablir les niveaux d'acétylation de l'histone H4 et d'améliorer la réponse de peur au contexte chez des souris âgées (Peleg *et al.*, 2010). Les effets bénéfiques d'un traitement chronique ou aigu aux IHDACs avant l'apprentissage ont également été rapportés chez des souris cérébro-lésées ou modèles de vieillissement accéléré, présentant un dysfonctionnement hippocampique (Fischer *et al.*, 2007; Fontan-Lozano *et al.*, 2008; Dash *et al.*, 2009) et chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Francis *et al.*, 2009; Kilgore *et al.*, 2010; Ricobaraza *et al.*, 2012). De plus, l'administration systémique de sodium butyrate améliore les performances des rats âgés en reconnaissance d'objet lorsque celle-ci intervient immédiatement après l'apprentissage (Reolon *et al.*, 2011). Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune étude décrivant les effets d'une injection post-acquisition d'IHDACs sur la consolidation de la mémoire spatiale chez l'animal âgé.

De manière intéressante, nous montrons que, contrairement à l'effet promnésiant obtenu chez les souris jeunes lors du test de compétition (chapitre II), l'injection intrahippocampique de TSA juste après l'apprentissage ne modifie pas la réponse comportementale des souris âgées qui maintiennent une stratégie indicée, quel que soit le délai de rétention (une heure ou 24h). Nos résultats du chapitre III indiquent également que l'injection de TSA perturbe la mémoire à long terme des souris âgées dans la tâche spatiale. Par ailleurs, les données d'imagerie montrent que l'injection de TSA augmente les niveaux d'acétylation de H3 et de H4 dans l'hippocampe, mais ne rétablit pas le niveau de phosphorylation de CREB hippocampique chez les souris âgées. Il semble donc que l'augmentation du niveau d'acétylation des histones au moment de la consolidation ne modifie pas ou perturbe la rétention de l'information spatiale testée à 24h. Ainsi, nos résultats diffèrent de ceux de la littérature montrant qu'un traitement chronique ou intrahippocampique avec des IHDACs permet de rétablir les niveaux d'acétylation des histones et d'améliorer la mémoire à long terme d'animaux âgés (Peleg *et al.*, 2010; Reolon *et al.*, 2011). Plusieurs facteurs, développés ci-dessous, peuvent expliquer les effets délétères de l'injection de TSA sur la mémoire spatiale des souris âgées.

### a) <u>L'injection post-apprentissage de TSA ne rétablirait pas</u> <u>l'interaction CREB/CBP</u>

Nos données d'imagerie montrent que la TSA ne permet pas de rétablir la phosphorylation de CREB dans l'hippocampe des souris âgées. Des études basées sur des processus d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendants ont montré que la perte de la fonction HAT de CBP peut être compensée par un traitement aux IHDACs (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004), ce qui n'est pas le cas de sa fonction co-activatrice de la transcription, qui dépend de sa fixation à CREB. En effet, l'administration systémique de sodium butyrate n'améliore pas les performances des souris Knock-Out pour mskl, présentant une perte d'activation de CREB (Chwang et al., 2007). De plus, un traitement à la TSA est inefficace sur les déficits d'apprentissage et de mémoire à long terme en conditionnement de peur au contexte chez des souris  $\alpha \Delta CREB$ , dont la mutation interfère avec le recrutement de CBP (Vecsey et al., 2007). Comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction, les traitements systémiques ou intra-hippocampiques aux IHDACs ne compensent pas les troubles mnésiques en conditionnement au contexte ou en reconnaissance de localisation d'objet chez des souris mutantes pour *cbp*, pour lesquelles l'interaction entre CREB et CBP est impossible (Chen et al., 2010; Barrett et al., 2011; McQuown et al., 2011). Enfin, selon Haettig et al. (2011), l'administration systémique de sodium butyrate améliore les performances mnésiques des souris *cbp<sup>KIX/KIX</sup>*, présentant une perte du domaine d'interaction entre CREB et CBP, dans un test de reconnaissance d'objet classique (dépendant du cortex insulaire) mais pas de localisation d'objet (dépendant de l'hippocampe). Ainsi, d'après cette étude et d'autres travaux récents (Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010), il semblerait que, lorsque l'interaction entre CREB et CBP est impossible, la capacité des IHDACs à améliorer la mémoire varie selon le degré d'implication de l'hippocampe dans la tâche à réaliser. Ces données permettent en partie d'expliquer nos résultats exposés dans les chapitres II. Nous montrons que l'injection intra-hippocampique de TSA favorise la sélection d'une stratégie spatiale chez les souris jeunes mais pas chez les souris âgées, lors du test de compétition. Parallèlement, nos données immunohistochimiques révèlent un large déficit d'activation de CREB, chez les souris âgées, suite à l'apprentissage, n'étant pas contré par l'administration de TSA. L'augmentation du niveau d'acétylation des histones ne permettrait donc pas de rétablir l'expression des gènes nécessaires à la consolidation de la mémoire, le défaut d'activation de CREB constituant alors un facteur limitant.

### b) <u>L'injection post-apprentissage de TSA ne rétablirait pas la</u> <u>fonction hippocampique</u>

Une autre explication de l'incapacité de l'administration de TSA à améliorer les performances des animaux âgés peut découler du fait que l'injection de cet IHDACs affecte l'expression de moins de 20 % des gènes et exerce un effet bidirectionnel (répression ou induction) sur la transcription (Clayton *et al.*, 2006; Rada-Iglesias *et al.*, 2007; Vadnal *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'effet facilitateur d'injections systémiques, en particulier lorsqu'elles sont répétées, ne peut être attribué exclusivement à une normalisation du niveau d'acétylation des histones dans l'hippocampe. En effet, de tels traitements peuvent également compenser la perte d'activité d'autres protéines connues pour être des substrats des HATs (facteurs de transcriptions, protéines du cytosquelette, récepteurs hormonaux intranucléaires, ..., Yang et Seto, 2008). Ainsi, des similitudes existent entre les effets facilitateurs d'une administration chronique d'IHDACs et l'exposition à un environnement enrichi d'animaux présentant un dysfonctionnement hippocampique, sur la neurogénèse hippocampique et les capacités de mémorisation (Fischer *et al.*, 2007; Dash *et al.*, 2009). De tels effets ne peuvent probablement pas être obtenus suite à une injection aigüe et locale d'IHDACs.

Enfin, un autre facteur permettant d'expliquer les différences d'effets de la TSA selon l'âge des souris pourrait être la nature de la tâche utilisée. En effet, **chez les souris âgées soumises à un apprentissage en piscine de Morris, le dysfonctionnement hippocampique peut être compensé par l'utilisation de stratégies alternatives** basées sur d'autres structures comme le striatum (Bach *et al.*, 1999; Fellini *et al.*, 2006). Ainsi, dans notre épreuve spatiale et dans notre test de compétition en piscine de Morris, on peut imaginer que les animaux âgés s'appuient majoritairement sur une stratégie striatum-dépendante afin de résoudre la tâche. Dans ce cas, il semble logique que l'injection intra-hippocampique de TSA ne permette pas d'améliorer les performances spatiales, dépendantes de l'intégrité de l'hippocampe. Au contraire, la TSA pourrait bouleverser la stratégie mise en place par les souris âgées et ainsi diminuer leurs performances spatiales.

#### C.3. Un effet délétère des IHDACs ?

À ce stade, nous avons cité un certain nombre d'arguments révélant que l'efficacité des IHDACs serait limitée à des conditions expérimentales particulières, qui ne sont pas réunies dans le cas du vieillissement normal. Ces données pourraient expliquer l'absence d'effet de la TSA chez les souris âgées lors de nos expériences exposées dans le chapitre II. Toutefois, nos données du chapitre III, montrant que l'administration intra-hippocampique de TSA aggrave les troubles mnésiques en mémoire spatiale observés au cours du vieillissement, impliquent de s'interroger sur le fait qu'un traitement aux IHDACs soit toujours bénéfique.

Plusieurs études montrent l'effet promnésiant des IHDACs dans le cadre du vieillissement pathologique, notamment chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Pour revue, Chuang et al., 2009). Il est important de prendre en compte le fait que ces modèles murins de la pathologie développent précocement les symptômes de la maladie. Les tests comportementaux sont effectués à un âge peu avancé (Fischer et al., 2007; Fontan-Lozano et al., 2008; Kilgore et al., 2010). Même si ces animaux présentent les altérations caractéristiques de la pathologie, toutes les voies moléculaires perturbées au cours du vieillissement normal ne sont pas affectées chez ces souris. Or, une étude montre une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 au cours du vieillissement chez des souris triple transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, alors que la TSA augmente considérablement l'acétylation de l'histone H3 chez ces souris jusqu'à l'âge de 11 mois, elle n'a plus d'effet à 21 mois. De plus, à l'âge de 19 mois, la TSA n'est plus capable de reverser la toxicité induite par un traitement au peptide Aß 1-42 (Walker et al., 2012). Les auteurs proposent l'existence d'un « switch épigénétique » au cours du vieillissement conduisant à l'augmentation du niveau d'acétylation des histones et au manque d'efficacité des IHDACs. Il semble donc important de tester l'effet des IHDACs sur les performances d'animaux modèles de pathologies neurodégénératives, évaluées à un âge avancé.
Différentes hypothèses peuvent également être formulées pour expliquer l'effet délétère de l'injection intra-hippocampique de TSA, obtenu chez les souris âgés soumises à un tâche spatiale en piscine de Morris (chapitre III).

#### a) L'administration de TSA potentialiserait la réponse au stress

Le vieillissement accroit l'anxiété et induit des perturbations mnésiques comparables à celles observées chez des sujets jeunes stressés (Tronche et al., 2010). Des études ont permis d'établir que les modifications d'acétylation des histones, notamment de H3, sont fortement impliquées dans le processus d'adaptation de la réponse comportementale à un événement stressant (Pour revue, Mifsud et al., 2011). Plusieurs expériences ont ainsi montré que l'administration de corticostérone ou l'exposition de souris ou de rats à un stress aigu de nage forcée induit l'activation de MSK1 et de Elk1, conduisant à une augmentation de la phosphorylation sur la serine 10 et de l'acétylation sur la lysine 14 de H3, dans les cellules granulaires du gyrus denté (Chandramohan et al., 2008; Reul et al., 2009; Mifsud et al., 2011). La tâche de navigation spatiale en piscine de Morris présentant une composante stressante pour les animaux (Akirav et al., 2001; Harrison et al., 2009), l'hyperacétylation de H3 observée chez les souris âgées suite à l'apprentissage spatial pourrait résulter d'une réponse exacerbée au stress. L'administration de TSA pourrait alors potentialiser cette réponse au stress causé par notre épreuve comportementale et conduire à l'altération des performances mnésiques des souris âgées en piscine de Morris (Figure 25). Cette hypothèse est soutenue par des données montrant que l'administration de SAHA dans le noyau basolatéral de l'amygdale induit un comportement hyperanxieux dans un open field ou en labyrinthe en croix surélevé (Adachi et al., 2009).



**Figure 25 : Une hypothèse pour expliquer l'effet délétère de l'injection intrahippocampique de TSA chez les souris âgées.** Chez les jeunes (en noir), un apprentissage spatial entraine l'activation de cascades moléculaires aboutissant à l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe et à la consolidation des informations acquises. Chez les souris âgées (en rouge), la diminution de l'activité PKA, combinée à une altération de la phosphorylation de CREB et à une augmentation de l'expression de certaines HDACs, notamment HDAC2, aboutirait à une perturbation de la transcription de gènes consécutive à l'altération de l'acétylation de H4. A l'inverse, une réponse exacerbée au stress causé par la tâche de navigation pourrait conduire à la suractivation des voies moléculaires régulant l'acétylation de H3 et exercer un effet délétère sur les performances mnésiques. L'augmentation du niveau d'acétylation par administration intra-hippocampique de Trichostatine A pourrait potentialiser ce phénomène. Enfin, HDAC4 serait un régulateur positif de la mémoire et son inhibition aggraverait les déficits mnésiques des animaux âgés.

#### b) <u>Certaines HDACs régulent positivement la formation de la</u> <u>mémoire</u>

L'augmentation du niveau d'acétylation est classiquement associée à l'induction de la transcription de gènes, ce qui favorise la consolidation de la mémoire. Cependant, certaines HDACs permettent de re-compacter la chromatine une fois que celle-ci a été ouverte, ce qui

résulte en une synchronisation fine des mécanismes d'acétylation/déacétylation (McQuown et Wood, 2011). Par exemple, chez la drosophile, l'inactivation du gène rpd3, codant pour une HDAC, par la technique d'interférence par ARN, induit des déficits mnésiques (Fitzsimons et Scott, 2011). Chez la souris, la perte sélective de l'expression de HDAC4 dans les neurones du cortex, de l'amygdale et de l'hippocampe entraine une altération de la plasticité synaptique, des déficits mnésiques en conditionnement de peur au contexte ainsi qu'une perturbation de la rétention des informations spatiales en piscine de Morris (Kim et al., 2012). Ainsi, alors que les HDACs 2 et 3 régulent négativement la formation d'une trace mnésique (Guan et al., 2009; McQuown et al., 2011), HDAC4 semble impliquée positivement dans la consolidation de la mémoire. A la différence des HDACs 2 et 3, qui se situent exclusivement dans le noyau cellulaire, HDAC4 est capable de se déplacer entre le noyau et le cytoplasme. Ce déplacement est sous le contrôle de la signalisation calcique (Backs et al., 2008) qui est fortement affectée par le vieillissement normal (Foster et Norris, 1997). Chez les souris âgées, une réduction de l'activité de HDAC4 pourrait contribuer au déclin mnésique lié à l'âge, l'administration d'un IHDACs venant aggraver ce phénomène (Figure 25). Il serait alors intéressant d'analyser, par western blot, les niveaux d'expression de HDAC4 au cours du vieillissement. De plus, il apparait capital de développer de nouveaux IHDACs ciblant spécifiquement les HDACs impliqués négativement dans la consolidation de la mémoire (HDACs 2 et 3), tout en épargnant HDAC4.

#### **D.** Conclusion et perspectives

Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois, une double dissociation de la fonction du striatum et de l'hippocampe dans les apprentissages de types procédural et relationnel/déclaratif respectivement, du point de vue des mécanismes d'acétylation des histones. Grâce à l'étude détaillée de l'induction de l'acétylation des histones H3 et H4, chez des animaux jeunes et âgés, suite à un apprentissage spatial ou indicé, nous montrons que l'acétylation de H4 dans l'hippocampe est un marqueur spécifique de la consolidation des informations spatiales. L'acétylation de H3, quant à elle semble davantage réactive à l'intégration du contexte et pourrait notamment refléter une réponse au stress associé à notre test comportemental. Nos résultats sont également les premiers révélant que, chez des animaux jeunes, l'administration intra-hippocampique de TSA est capable de moduler les interactions hippocampe-striatum, afin d'aboutir à l'utilisation préférentielle des informations

spatiales (dépendante de l'hippocampe) au détriment de la mise en place d'une stratégie indicée (dépendante du striatum). Enfin, chez les animaux âgés, nous montrons que l'injection intra-hippocampique de TSA post-apprentissage exerce un effet délétère sur la mémorisation des informations spatiales en piscine de Morris.

Afin de poursuivre ces travaux, plusieurs expériences pourraient être mises en œuvre. Tout d'abord, nous nous sommes focalisés sur l'effet d'une injection aigue de TSA, intervenant spécifiquement durant la phase de consolidation de la mémoire. Il serait intéressant de confirmer l'effet délétère de l'inhibition des HDACs, dans des conditions expérimentales différentes. Par exemple, l'effet de la TSA ou d'un autre IHDACs comme le SAHA, moins toxique, pourrait être testé dans d'autres tests comportementaux (conditionnement de peur au contexte, reconnaissance de localisation d'objet ou apprentissage distribué en piscine de Morris), en l'administrant avant l'apprentissage ou encore de manière chronique.

Les différentes hypothèses émises pour expliquer le manque d'effet ou l'effet délétère de l'administration intra-hippocampique de TSA chez les animaux âgés pourraient être étayées par la réalisation de plusieurs expériences. En premier lieu, si nos résultats apportent des arguments en faveur de la nécessité de l'interaction CREB/CBP pour l'effet promnésiant des IHDACs, nous n'avons pas étudié spécifiquement l'effet de l'injection intra-hippocampique de TSA, chez des souris âgées, dans des conditions où l'activation de CREB est normalisée. Une expérience, consistant en l'injection intra-hippocampique de vecteurs viraux qui permettent l'expression de CREB constitutivement actif, pourrait être mise en œuvre. L'incorporation de ce virus dans les neurones du CA1 et du gyrus denté permet d'augmenter la réponse de peur suite à un conditionnement au contexte (Restivo *et al.*, 2009a). L'injection conjointe de tels vecteurs viraux et de TSA dans l'hippocampe devrait ainsi permettre de favoriser la mémorisation des informations spatiales chez les souris âgées. Une alternative à l'utilisation de ce virus afin de rétablir l'activation de CREB pourrait être l'administration d'un analogue de l'AMPc (le Sp-AMPc) dans l'hippocampe.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'injection intra-hippocampique de TSA potentialise l'hyperacétylation de H3 chez les individus âgées suite à une réponse exacerbée au stress provoquée par notre test comportemental, nous proposons d'inhiber cette réponse par administration de RU-38486, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, dans l'hippocampe des souris âgées. Cette approche pharmacologique devrait alors bloquer l'hyperacétylation de H3 et permettre l'amélioration de la consolidation des informations spatiales par la TSA chez les individus âgés.

L'ensemble de nos données amènent à relativiser la perspective des traitements aux IHDACs afin de retarder les troubles cognitifs, notamment dans le cadre de pathologies neurodégénératives. Ces dernières années, une alternative thérapeutique à l'utilisation de ces IHDACs, visant à augmenter l'activité des HATs, est apparue. Le développement de tels activateurs a été ralenti par leur incapacité à traverser les membranes cellulaires. Cependant, ces dernières années, le N-(4-chloro-3-trifluoromethylphenyl)-2-ethoxybenzamide (CTPB), un activateur de CBP/p300, a été couplé à des nanoparticules de carbone. Ce couplage lui permet, une fois injecté par voie systémique, de se propager dans l'organisme entier et surtout, de traverser la barrière hématoencéphalique afin de diffuser dans le cerveau (Selvi *et al.*, 2008). Chez le rat, l'administration sous-cutanée et chronique de CTPB augmente l'acétylation de H3 et de H2B dans l'hippocampe (Selvi *et al.*, 2010). Cette perspective prometteuse nécessiterait alors de tester ces activateurs de HATs sur les processus de mémorisation chez des animaux jeunes et âgés dans des tâches comportementales dépendantes de l'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe.

Discussion générale

Références bibliographiques

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

A

- Abel T, Nguyen PV (2008) Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMPdependent protein kinase. Prog Brain Res 169:97-115.
- Adachi M, Autry AE, Covington HE, 3rd, Monteggia LM (2009) MeCP2-mediated transcription repression in the basolateral amygdala may underlie heightened anxiety in a mouse model of Rett syndrome. J Neurosci 29:4218-4227.
- Addis DR, Moscovitch M, Crawley AP, McAndrews MP (2004) Recollective qualities modulate hippocampal activation during autobiographical memory retrieval. Hippocampus 14:752-762.
- Akirav I, Sandi C, Richter-Levin G (2001) Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. Eur J Neurosci 14:719-725.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. Neuron 42:947-959.
- Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER (1994) C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. Cell 76:1099-1114.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 51:786-794.
- Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. Proc Natl Acad Sci U S A 91:7041-7045.
- Amaral DG, Witter MP (1995) Hippocampal formation. In: The rat nervous system (Paxinos G, ed). New York: Academic Press.
- 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.
- Atkinson RC, Shiffrin RM (1968) Human memory: A proposed system and its control processes. In: The psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory (Spence KW, ed), pp 89-195. New York: Academic press.

B

- Babb SJ, Crystal JD (2006a) Discrimination of what, when, and where is not based on time of day. Learn Behav 34:124-130.
- Babb SJ, Crystal JD (2006b) Episodic-like memory in the rat. Curr Biol 16:1317-1321.
- Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (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, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN (2008) Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. Mol Cell Biol 28:3437-3445.
- Baddeley A (1988) Cognitive psychology and human memory. Trends Neurosci 11:176-181.
- Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bahr M, Burkhardt S, Delalle I, Kugler S, Fischer A, Sananbenesi F (2012) HDAC1 regulates fear extinction in mice. J Neurosci 32:5062-5073.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A 93:13445-13452.
- Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ (2008) A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in Tcell lymphomas. Leukemia 22:1026-1034.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F (2008) The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. Learn Mem 15:618-624.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005) Reversing histone methylation. Nature 436:1103-1106.
- Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E (1998) Rolipram, a type IVspecific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting longterm potentiation and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15020-15025.
- 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.
- Baudonnat M, Guillou JL, Husson M, Vandesquille M, Corio M, Decorte L, Faugere A, Porte Y, Mons N, David V (2011) Disrupting effect of drug-induced reward on spatial but

not cue-guided learning: implication of the striatal protein kinase A/cAMP response element-binding protein pathway. J Neurosci 31:16517-16528.

- Beaunieux H, Hubert V, Witkowski T, Pitel AL, Rossi S, Danion JM, Desgranges B, Eustache F (2006) Which processes are involved in cognitive procedural learning? Memory 14:521-539.
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature 447:407-412.
- Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y (1998) Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. J Neurosci 18:10037-10044.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 94:7041-7046.
- Bilang-Bleuel A, Ulbricht S, Chandramohan Y, De Carli S, Droste SK, Reul JM (2005) Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioural response. Eur J Neurosci 22:1691-1700.
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. Nature 447:396-398.
- Bird LR, Roberts WA, Abroms B, Kit KA, Crupi C (2003) Spatial memory for food hidden by rats (Rattus norvegicus) on the radial maze: studies of memory for where, what, and when. J Comp Psychol 117:176-187.
- Blanchard J, Martel G, Guillou JL, Nogues X, Micheau J (2008) Impairment of spatial memory consolidation in APP(751SL) mice results in cue-guided response. Neurobiol Aging 29:1011-1021.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 232:331-356.
- 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.
- Bolhuis JJ, Stewart CA, Forrest EM (1994) Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. Q J Exp Psychol B 47:129-150.

- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. Nature 400:671-675.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. Learn Mem 5:365-374.
- Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gossweiler S, Romashko D, Scott R, Tully T (2003) A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10518-10522.
- Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient longterm memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive elementbinding protein. Cell 79:59-68.
- 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.
- Bozon B, Davis S, Laroche S (2002) Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. Hippocampus 12:570-577.
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S (2003) MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358:805-814.
- Brightwell JJ, Gallagher M, Colombo PJ (2004) Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. Neurobiol Learn Mem 81:19-26.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. Learn Mem 13:187-191.
- Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, Young W, Bloom FE, Winrow CJ (2007) Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. J Mol Neurosci 31:47-58.

- Brush MH, Guardiola A, Connor JH, Yao TP, Shenolikar S (2004) Deactylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. J Biol Chem 279:7685-7691.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci 7:30-40.

#### C

- Calfa G, Chapleau CA, Campbell S, Inoue T, Morse SJ, Lubin FD, Pozzo-Miller L (2011) HDAC activity is required for BDNF to increase quantal neurotransmitter release and dendritic spine density in CA1 pyramidal neurons. Hippocampus.
- Canettieri G, Morantte I, Guzman E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, Yates JR, 3rd, Montminy M (2003) Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. Nat Struct Biol 10:175-181.
- Cao J, Yan Q (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. Front Oncol 2:26.
- Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR (2012) Agerelated memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. PLoS One 7:e33249.
- 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.
- 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.
- Chang Q, Gold PE (2003a) Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. J Neurosci 23:3001-3005.
- Chang Q, Gold PE (2003b) Intra-hippocampal lidocaine injections impair acquisition of a place task and facilitate acquisition of a response task in rats. Behav Brain Res 144:19-24.

- Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL, Brown TH (1990) Long-term synaptic potentiation in the amygdala. Synapse 6:271-278.
- 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 RH, Sarnecki C, Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rskencoded protein kinases. Mol Cell Biol 12:915-927.
- 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.
- Cho YH, Beracochea D, Jaffard R (1993) Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. J Neurosci 13:1759-1766.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. Nature 365:855-859.
- Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT (2009) Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. Trends Neurosci 32:591-601.
- Chung YH, Kim EJ, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Woo HW, Cha CI (2002) Age-related changes in CREB binding protein immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of rats. Brain Res 956:312-318.
- 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.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005a) Hippocampus and remote spatial memory in rats. Hippocampus 15:260-272.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005b) Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. Hippocampus 15:340-346.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2007) The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze. J Neurosci 27:6647-6654.

- Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC (2006) Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. Mol Cell 23:289-296.
- Clayton NS, Dickinson A (1998) Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. Nature 395:272-274.
- Clayton NS, Bussey TJ, Dickinson A (2003) Can animals recall the past and plan for the future? Nat Rev Neurosci 4:685-691.
- Clements A, Poux AN, Lo WS, Pillus L, Berger SL, Marmorstein R (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. Mol Cell 12:461-473.
- Cohen NJ (1984) Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In: Neuropsychology of Memory (Squire LR, Butters N, eds), pp 83-103. New-York: Guilford Press.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. J Physiol 334:33-46.
- Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA (2003) Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. J Neurosci 23:3547-3554.
- Coogan AN, O'Leary DM, O'Connor JJ (1999) P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro. J Neurophysiol 81:103-110.
- 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

- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev 36:60-90.
- Dash PK, Orsi SA, Moore AN (2009) Histone deactylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. Neuroscience 163:1-8.

- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. Psychol Bull 96:518-559.
- Davis S, Laroche S (1998) A molecular biological approach to synaptic plasticity and learning. C R Acad Sci III 321:97-107.
- 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 (2011) Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron 70:813-829.
- de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005) Do protein motifs read the histone code? Bioessays 27:164-175.
- De Leonibus E, Lafenetre P, Oliverio A, Mele A (2003) Pharmacological evidence of the role of dorsal striatum in spatial memory consolidation in mice. Behav Neurosci 117:685-694.
- de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimaraes MR, Scalco FS, Roesler R, Schroder N (2008) Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. Neuropharmacology 55:788-792.
- 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.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2005) Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. Brain Res Brain Res Protoc 16:10-19.
- Devan BD, White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. J Neurosci 19:2789-2798.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL (1996) Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. Neurobiol Learn Mem 66:305-323.
- Devan BD, McDonald RJ, White NM (1999) Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. Behav Brain Res 100:5-14.
- Dokmanovic M, Marks PA (2005) Prospects: histone deacetylase inhibitors. J Cell Biochem 96:293-304.

- Douville K, Woodard JL, Seidenberg M, Miller SK, Leveroni CL, Nielson KA, Franczak M, Antuono P, Rao SM (2005) Medial temporal lobe activity for recognition of recent and remote famous names: an event-related fMRI study. Neuropsychologia 43:693-703.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? Annu Rev Psychol 55:51-86.
- Dudai Y, Morris RG (2000) To consolidate or not to consolidate: What are the questions? In: Brain, perception, memory (Bolhuis JJ, ed), pp 149-162. Oxford: Oxford University Press.
- Dutnall RN, Ramakrishnan V (1997) Twists and turns of the nucleosome: tails without ends. Structure 5:1255-1259.

#### E

- Eberharter A, Becker PB (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. EMBO Rep 3:224-229.
- Eichenbaum H (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. Behav Brain Res 103:123-133.
- Eichenbaum H, Mathews P, Cohen NJ (1989) Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. Behav Neurosci 103:1207-1216.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RG (1990) Hippocampal representation in place learning. J Neurosci 10:3531-3542.
- Eichenbaum H, Fagan A, Mathews P, Cohen NJ (1988) Hippocampal system dysfunction and odor discrimination learning in rats: impairment or facilitation depending on representational demands. Behav Neurosci 102:331-339.
- Eissenberg JC, Elgin SC (2005) Molecular biology: antagonizing the neighbours. Nature 438:1090-1091.
- English JD, Sweatt JD (1996) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. J Biol Chem 271:24329-24332.
- Etchamendy N, Desmedt A, Cortes-Torrea C, Marighetto A, Jaffard R (2003) Hippocampal lesions and discrimination performance of mice in the radial maze: sparing or impairment depending on the representational demands of the task. Hippocampus 13:197-211.

#### F

- Fass DM, Reis SA, Ghosh B, Hennig KM, Joseph NF, Zhao WN, Nieland TJ, Guan JS, Groves Kuhnle CE, Tang W, Barker DD, Mazitschek R, Schreiber SL, Tsai LH, Haggarty SJ (2012) Crebinostat: A novel cognitive enhancer that inhibits histone deacetylase activity and modulates chromatin-mediated neuroplasticity. Neuropharmacology.
- Federman N, Fustinana MS, Romano A (2009) Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. Learn Mem 16:600-606.
- Fellini L, Schachner M, Morellini F (2006) Adult but not aged C57BL/6 male mice are capable of using geometry for orientation. Learn Mem 13:473-481.
- Fioravante D, Liu RY, Byrne JH (2008) The ubiquitin-proteasome system is necessary for long-term synaptic depression in Aplysia. J Neurosci 28:10245-10256.
- 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.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol 15:172-183.
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. Nature 438:1116-1122.
- Fitzsimons HL, Scott MJ (2011) Genetic modulation of Rpd3 expression impairs long-term courtship memory in Drosophila. PLoS One 6:e29171.
- Florian C, Mons N, Roullet P (2006) CREB antisense oligodeoxynucleotide administration into the dorsal hippocampal CA3 region impairs long- but not short-term spatial memory in mice. Learn Mem 13:465-472.
- Fontan-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Munera A, Delgado-Garcia JM, Carrion AM (2008) Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. Mol Cell Neurosci 39:193-201.
- Fordyce DE, Wehner JM (1993) Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase C in mice. Neurobiol Aging 14:309-317.

- Forsberg EC, Bresnick EH (2001) Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. Bioessays 23:820-830.
- Forster MJ, Dubey A, Dawson KM, Stutts WA, Lal H, Sohal RS (1996) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A 93:4765-4769.
- Foster TC, Norris CM (1997) Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. Hippocampus 7:602-612.
- Francis YI, Stephanou A, Latchman DS (2006) CREB-binding protein activation by presenilin 1 but not by its M146L mutant. Neuroreport 17:917-921.
- Francis YI, Diss JK, Kariti M, Stephanou A, Latchman DS (2007) p300 activation by Presenilin 1 but not by its M146L mutant. Neurosci Lett 413:137-140.
- 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.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. Nat Rev Neurosci 6:119-130.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, C.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. Science 260:1661-1664.
- Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J (2000) Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. Neuroscience 95:293-307.
- 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.
- Fuchikami M, Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Yamawaki S (2010) Epigenetic regulation of BDNF gene in response to stress. Psychiatry Investig 7:251-256.

### G

Gabrieli JD, Corkin S, Mickel SF, Growdon JH (1993) Intact acquisition and long-term retention of mirror-tracing skill in Alzheimer's disease and in global amnesia. Behav Neurosci 107:899-910.

- Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F (2000) Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. Brain 123 Pt 3:499-507.
- 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.
- Gao J, Siddoway B, Huang Q, Xia H (2009) Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase. Biochem Biophys Res Commun 379:1-5.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. J Biol Chem 277:25748-25755.
- Gastambide F, Viollet C, Lepousez G, Epelbaum J, Guillou JL (2009) Hippocampal SSTR4 somatostatin receptors control the selection of memory strategies. Psychopharmacology (Berl) 202:153-163.
- Ghiglieri V, Sgobio C, Costa C, Picconi B, Calabresi P (2011) Striatum-hippocampus balance: from physiological behavior to interneuronal pathology. Prog Neurobiol 94:102-114.
- Gill KM, Bernstein IL, Mizumori SJ (2007) Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: effects of explicit place and response training. Neurobiol Learn Mem 87:583-596.
- Giordano A, Avantaggiati ML (1999) p300 and CBP: partners for life and death. J Cell Physiol 181:218-230.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of nonhistone proteins. Gene 363:15-23.
- Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G (2011) Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. Eur J Neurosci 33:383-390.
- Goodman RH, Smolik S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev 14:1553-1577.
- Graff J, Mansuy IM (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. Behav Brain Res 192:70-87.
- Granon S, Poucet B (1995) Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. Behav Neurosci 109:474-484.

Graybiel AM (1995) The basal ganglia. Trends Neurosci 18:60-62.

- Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. Annu Rev Neurosci 31:359-387.
- Griffiths D, Dickinson A, Clayton N (1999) Episodic memory: what can animals remember about their past? Trends Cogn Sci 3:74-80.
- Grozinger CM, Schreiber SL (2002) Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. Chem Biol 9:3-16.
- Grunstein M (1992) Histones as regulators of genes. Sci Am 267:68-74B.
- 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.
- Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, Kandel ER (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. Cell 111:483-493.
- Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Morfett H, Hesketh SA, Kersante F, Reul JM (2011) Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 108:13806-13811.
- Guzowski JF (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. Hippocampus 12:86-104.
- Guzowski JF, McGaugh JL (1997) Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. Proc Natl Acad Sci U S A 94:2693-2698.

## H

- Ha CH, Kim JY, Zhao J, Wang W, Jhun BS, Wong C, Jin ZG (2010) PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 107:15467-15472.
- Haettig J, Stefanko DP, Multani ML, Figueroa DX, McQuown SC, Wood MA (2011) HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. Learn Mem 18:71-79.

- Haggarty SJ, Tsai LH (2011) Probing the role of HDACs and mechanisms of chromatinmediated neuroplasticity. Neurobiol Learn Mem 96:41-52.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4389-4394.
- Haist F, Bowden Gore J, Mao H (2001) Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. Nat Neurosci 4:1139-1145.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA (2007) Neuronal competition and selection during memory formation. Science 316:457-460.
- Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. Behav Brain Res 198:247-251.
- Hatfield T, McGaugh JL (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. Neurobiol Learn Mem 71:232-239.
- Hawk JD, Florian C, Abel T (2011) Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. Learn Mem 18:367-370.
- Hazzalin CA, Mahadevan LC (2005) Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. PLoS Biol 3:e393.
- Hebb DO (1949) The organization of behavior: A neuropsychological theory. New-York: Wiley.
- Hedden T, Gabrieli JD (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. Nat Rev Neurosci 5:87-96.
- Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH (1997) Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. Cell 89:115-126.
- Henke K (2010) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. Nat Rev Neurosci 11:523-532.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. Oncogene 26:5528-5540.

- Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN (2002) Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. Genes Brain Behav 1:55-69.
- Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, de los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J, Jaye M (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. J Pharmacol Exp Ther 307:720-728.

### I-J-K

- Iaria G, Petrides M, Dagher A, Pike B, Bohbot VD (2003) Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate nucleus in human navigation: variability and change with practice. J Neurosci 23:5945-5952.
- Impey S, Obrietan K, Storm DR (1999) Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. Neuron 23:11-14.
- Impey S, Fong AL, Wang Y, Cardinaux JR, Fass DM, Obrietan K, Wayman GA, Storm DR, Soderling TR, Goodman RH (2002) Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. Neuron 34:235-244.
- Jaffard R, Meunier M (1993) Role of the hippocampal formation in learning and memory. Hippocampus 3 Spec No:203-217.
- Janknecht R, Nordheim A (1996) MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. Biochem Biophys Res Commun 228:831-837.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. Science 293:1074-1080.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. J Neurosci 14:7347-7356.
- Kalkhoven E (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. Biochem Pharmacol 68:1145-1155.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science 294:1030-1038.
- Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. J Neurosci 23:5354-5360.
- Kennard JA, Woodruff-Pak DS (2011) Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. Front Aging Neurosci 3:9.

- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M (2008) Determination of the class and isoform selectivity of smallmolecule histone deacetylase inhibitors. Biochem J 409:581-589.
- Khochbin S (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. Gene 271:1-12.
- Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. Cell 116:259-272.
- 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.
- Kim JJ, Baxter MG (2001) Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. Trends Neurosci 24:324-330.
- Kim MS, Akhtar MW, Adachi M, Mahgoub M, Bassel-Duby R, Kavalali ET, Olson EN, Monteggia LM (2012) An essential role for histone deacetylase 4 in synaptic plasticity and memory formation. J Neurosci 32:10879-10886.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. Neuron 42:961-972.
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. Science 279:703-707.
- 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.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. Cell 128:693-705.
- Krazem A, Marighetto A, Higueret P, Jaffard R (2003) Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. Behav Brain Res 147:17-29.

### L

Laroche S, Jay TM, Thierry AM (1990) Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. Neurosci Lett 114:184-190.

- Lavenex P, Amaral DG (2000) Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. Hippocampus 10:420-430.
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C (2008) A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. Proc Natl Acad Sci U S A 105:17163-17168.
- Lee H, Rezai-Zadeh N, Seto E (2004) Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. Mol Cell Biol 24:765-773.
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A (2007) Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. Cell 131:1084-1096.
- Lenck-Santini PP, Save E, Poucet B (2001) Evidence for a relationship between place-cell spatial firing and spatial memory performance. Hippocampus 11:377-390.
- Lenck-Santini PP, Muller RU, Save E, Poucet B (2002) Relationships between place cell firing fields and navigational decisions by rats. J Neurosci 22:9035-9047.
- 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.
- Li Q, Xiao H, Isobe K (2002) Histone acetyltransferase activities of cAMP-regulated enhancer-binding protein and p300 in tissues of fetal, young, and old mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57:B93-98.
- 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.
- Lubow RE (1973) Latent inhibition. Psychol Bull 79:398-407.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. J Mol Biol 272:301-311.
- Lynch G, Rex CS, Gall CM (2007) LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. Neuropharmacology 52:12-23.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. Nature 305:719-721.

#### Μ

- MacKinnon D, Squire LR (1989) Autobiographical memory in amnesia. Psychobiology 17:247-256.
- Magnusson KR (1998) Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. Mech Ageing Dev 104:227-248.
- Magnusson KR, Scruggs B, Zhao X, Hammersmark R (2007) Age-related declines in a twoday reference memory task are associated with changes in NMDA receptor subunits in mice. BMC Neurosci 8:43.
- Maguire EA, Frith CD (2003) Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. J Neurosci 23:5302-5307.
- Maharana C, Sharma KP, Sharma SK (2010) Depolarization induces acetylation of histone H2B in the hippocampus. Neuroscience 167:354-360.
- Malinow R, Miller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. Nature 320:529-530.
- Marchetti C, Tafi E, Marie H (2011) Viral-mediated expression of a constitutively active form of cAMP response element binding protein in the dentate gyrus increases long term synaptic plasticity. Neuroscience 190:21-26.
- Marie H, Morishita W, Yu X, Calakos N, Malenka RC (2005) Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. Neuron 45:741-752.
- Marighetto A, Etchamendy N, Touzani K, Torrea CC, Yee BK, Rawlins JN, Jaffard R (1999) Knowing which and knowing what: a potential mouse model for age-related human declarative memory decline. Eur J Neurosci 11:3312-3322.
- Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK (2004) Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res 91:137-168.
- Martel G, Millard A, Jaffard R, Guillou JL (2006) Stimulation of hippocampal adenylyl cyclase activity dissociates memory consolidation processes for response and place learning. Learn Mem 13:342-348.
- Martel G, Blanchard J, Mons N, Gastambide F, Micheau J, Guillou JL (2007) Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution. Neuroscience 150:743-753.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. Annu Rev Neurosci 23:649-711.

- Martin SJ, de Hoz L, Morris RG (2005) Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. Neuropsychologia 43:609-624.
- Martinez-Balbas MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. EMBO J 17:2886-2893.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. Science 305:96-99.
- McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. Behav Neurosci 107:3-22.
- McDonald RJ, White NM (1994) Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. Behav Neural Biol 61:260-270.
- McGahon B, Maguire C, Kelly A, Lynch MA (1999) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid and trans-1-amino-cyclopentyl-1,3- dicarboxylate impacts on long-term potentiation in the dentate gyrus in the rat: analysis of age-related changes. Neuroscience 90:1167-1175.
- McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. Science 153:1351-1358.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. Science 287:248-251.
- McGhee JD, Felsenfeld G (1980) Nucleosome structure. Annu Rev Biochem 49:1115-1156.
- McQuown SC, Wood MA (2011) HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. Neurobiol Learn Mem 96:27-34.
- McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, Mullican SE, Jones S, Rusche JR, Lazar MA, Wood MA (2011) HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. J Neurosci 31:764-774.
- 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.
- Mingaud F, Le Moine C, Etchamendy N, Mormede C, Jaffard R, Marighetto A (2007) The hippocampus plays a critical role at encoding discontiguous events for subsequent declarative memory expression in mice. Hippocampus 17:264-270.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T (2002) CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. Behav Brain Res 133:135-141.

- Moghaddam M, Bures J (1996) Contribution of egocentric spatial memory to place navigation of rats in the Morris water maze. Behav Brain Res 78:121-129.
- Mons N, Guillou JL, Jaffard R (1999) The role of Ca2+/calmodulin-stimulable adenylyl cyclases as molecular coincidence detectors in memory formation. Cell Mol Life Sci 55:525-533.
- Mons N, Segu L, Nogues X, Buhot MC (2004) Effects of age and spatial learning on adenylyl cyclase mRNA expression in the mouse hippocampus. Neurobiol Aging 25:1095-1106.
- Monti B, Berteotti C, Contestabile A (2005) Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment. Hippocampus 15:1041-1049.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 11:47-60.
- Morris RG (2001) Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356:1453-1465.
- Morris RG, Davis S, Butcher SP (1990) Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 329:187-204.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297:681-683.
- Morrison BE, Majdzadeh N, D'Mello SR (2007) Histone deacetylases: focus on the nervous system. Cell Mol Life Sci 64:2258-2269.
- Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS (2006) The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. Curr Opin Neurobiol 16:179-190.
- Müller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle Bieträge zur ehre vom Gedächtnis. Z. Psychol Erganzungsband 1:1-300.

### **N-O**

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

- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M (2000) Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. Hippocampus 10:352-368.
- Naqshbandi M, Feeney MC, McKenzie TL, Roberts WA (2007) Testing for episodic-like memory in rats in the absence of time of day cues: replication of Babb and Crystal. Behav Processes 74:217-225.
- Nelson ED, Monteggia LM (2011) Epigenetics in the mature mammalian brain: effects on behavior and synaptic transmission. Neurobiol Learn Mem 96:53-60.
- Nicolle MM, Prescott S, Bizon JL (2003) Emergence of a cue strategy preference on the water maze task in aged C57B6 x SJL F1 hybrid mice. Learn Mem 10:520-524.
- Norris CM, Halpain S, Foster TC (1998) Alterations in the balance of protein kinase/phosphatase activities parallel reduced synaptic strength during aging. J Neurophysiol 80:1567-1570.
- 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. In. Oxford: Oxford University Press.
- 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.
- Otani S, Abraham WC (1989) Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats. Neurosci Lett 106:175-180.

### Р

- Packard MG (1999) Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12881-12886.
- Packard MG, McGaugh JL (1992) Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. Behav Neurosci 106:439-446.

- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. Neurobiol Learn Mem 65:65-72.
- Packard MG, Teather LA (1997a) Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5phosphonopentanoic acid. Behav Neurosci 111:543-551.
- Packard MG, Teather LA (1997b) Posttraining injections of MK-801 produce a timedependent impairment of memory in two water maze tasks. Neurobiol Learn Mem 68:42-50.
- Packard MG, Teather LA (1998) Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. Neurobiol Learn Mem 69:163-203.
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. Annu Rev Neurosci 25:563-593.
- Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. J Neurosci 9:1465-1472.
- Passarge E (1979) Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. Am J Hum Genet 31:106-115.
- Peixoto L, Abel T (2012) The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments. Neuropsychopharmacology.
- 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.
- Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B (2011) Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. Mol Biol Rep 38:453-460.
- Penner MR, Roth TL, Barnes CA, Sweatt JD (2010) An epigenetic hypothesis of agingrelated cognitive dysfunction. Front Aging Neurosci 2:9.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. Neuron 34:447-462.
- Poldrack RA, Packard MG (2003) Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. Neuropsychologia 41:245-251.

- Poldrack RA, Clark J, Pare-Blagoev EJ, Shohamy D, Creso Moyano J, Myers C, Gluck MA (2001) Interactive memory systems in the human brain. Nature 414:546-550.
- Porte Y, Buhot MC, Mons N (2008a) Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. Neurobiol Aging 29:1533-1546.
- Porte Y, Buhot MC, Mons NE (2008b) Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. Learn Mem 15:885-894.
- Porte Y, Trifilieff P, Wolff M, Micheau J, Buhot MC, Mons N (2011) Extinction of spatial memory alters CREB phosphorylation in hippocampal CA1. Hippocampus 21:1169-1179.
- Poucet B, Thinus-Blanc C, Muller RU (1994) Place cells in the ventral hippocampus of rats. Neuroreport 5:2045-2048.
- Poucet B, Lenck-Santini PP, Paz-Villagran V, Save E (2003) Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. J Physiol Paris 97:537-546.
- Puckett RE, Lubin FD (2011) Epigenetic mechanisms in experience-driven memory formation and behavior. Epigenomics 3:649-664.

# Q-R

- Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA (1997) Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. Behav Pharmacol 8:713-717.
- Quirarte GL, de la Teja IS, Casillas M, Serafin N, Prado-Alcala RA, Roozendaal B (2009) Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. Learn Mem 16:586-589.
- Racine A, Page V, Nagy S, Grabowski D, Tanny JC (2012) Histone H2B Ubiquitylation Promotes Activity of the Intact Set1 Histone Methyltransferase Complex in Fission Yeast. J Biol Chem 287:19040-19047.
- Racine RJ, Milgram NW, Hafner S (1983) Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. Brain Res 260:217-231.
- Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameur A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, Wilcox S, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Dunham I, Komorowski J, Wadelius C (2007)

Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. Genome Res 17:708-719.

- Rai M, Soragni E, Chou CJ, Barnes G, Jones S, Rusche JR, Gottesfeld JM, Pandolfo M (2010) Two new pimelic diphenylamide HDAC inhibitors induce sustained frataxin upregulation in cells from Friedreich's ataxia patients and in a mouse model. PLoS One 5:e8825.
- Ramon Y Cajal S (1911) Histologie du système nerveux de l'Homme et vertébrés. Paris: Maloine.
- Ramos JM (1998) Retrograde amnesia for spatial information: a dissociation between intra and extramaze cues following hippocampus lesions in rats. Eur J Neurosci 10:3295-3301.
- Reissner KJ, Shobe JL, Carew TJ (2006) Molecular nodes in memory processing: insights from Aplysia. Cell Mol Life Sci 63:963-974.
- Renthal W, Nestler EJ (2009) Histone acetylation in drug addiction. Semin Cell Dev Biol 20:387-394.
- Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schroder N, Wood MA, Roesler R (2011) Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. Behav Brain Res 221:329-332.
- Restivo L, Tafi E, Ammassari-Teule M, Marie H (2009a) Viral-mediated expression of a constitutively active form of CREB in hippocampal neurons increases memory. Hippocampus 19:228-234.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009b) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. J Neurosci 29:8206-8214.
- 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.
- Ribot T (1881) Les maladies de la mémoire. Paris: Alcan.
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution. Nature 311:532-537.

- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Marco S, Perez-Otano I, Garcia-Osta A (2012) Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. Hippocampus 22:1040-1050.
- Roberts WA (2002) Are animals stuck in time? Psychol Bull 128:473-489.
- Rolls ET, Kesner RP (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. Prog Neurobiol 79:1-48.
- Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA (2010) Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. J Neurosci 30:5037-5046.
- Rosenbaum RS, Priselac S, Kohler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M (2000) Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. Nat Neurosci 3:1044-1048.

### S

- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. Mol Cell Neurosci 21:463-476.
- Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2003) Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. J Neurosci 23:11436-11443.
- Sarantis K, Antoniou K, Matsokis N, Angelatou F (2012) Exposure to novel environment is characterized by an interaction of D1/NMDA receptors underlined by phosphorylation of the NMDA and AMPA receptor subunits and activation of ERK1/2 signaling, leading to epigenetic changes and gene expression in rat hippocampus. Neurochem Int 60:55-67.
- Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ, 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J (2004) Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. Neuron 42:23-36.
- Schacter DL, Tulving E (1994) What are the memory systems of 1994. In: Memory systems (Schacter DL, Tulving E, eds), pp 1-38. Cambridge MA: MIT Press.

- 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.
- Schimanski LA, Nguyen PV (2004) Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains. Neurosci Biobehav Rev 28:463-483.
- Schroeder JP, Wingard JC, Packard MG (2002) Post-training reversible inactivation of hippocampus reveals interference between memory systems. Hippocampus 12:280-284.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20:11-21.
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD (1999) A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. Learn Mem 6:478-490.
- 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, Eswaramoorthy M, Kundu TK (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 S, Rakoczy S, Brown-Borg H (2010) Assessment of spatial memory in mice. Life Sci 87:521-536.
- Sherry DF, Schacter DL (1987) The evolution of multiple memory system. Psychol Rev 94:439-454.
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. Science 290:1170-1174.
- Shohamy D, Wagner AD (2008) Integrating memories in the human brain: hippocampalmidbrain encoding of overlapping events. Neuron 60:378-389.
- Smith CN, Squire LR (2009) Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of the memory. J Neurosci 29:930-938.
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. EMBO J 22:2788-2797.

- Sorensen KE, Witter MP (1983) Entorhinal efferents reach the caudato-putamen. Neurosci Lett 35:259-264.
- Squire LR (1987) The organization and neural substrates of human memory. Int J Neurol 21-22:218-222.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99:195-231.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 82:171-177.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. Curr Opin Neurobiol 5:169-177.
- Squire LR, Knowlton BJ (1996) Memory, hippocampus and brain systems. In: The cognitive neurosciences (Gazzaniga MS, ed), pp 825-837. Cambridge MA: MIT Press.
- Squire LR, Bayley PJ (2007) The neuroscience of remote memory. Curr Opin Neurobiol 17:185-196.
- Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM (2012) Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. Biol Psychiatry 72:25-33.
- 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.
- Stein-Behrens BA, Sapolsky RM (1992) Stress, glucocorticoids, and aging. Aging (Milano) 4:197-210.
- Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev 64:435-459.
- 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.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. Nature 403:41-45.
- Suganuma T, Workman JL (2008) Crosstalk among Histone Modifications. Cell 135:604-607.
- Suganuma T, Workman JL (2011) Signals and combinatorial functions of histone modifications. Annu Rev Biochem 80:473-499.
- Sultan FA, Day JJ (2011) Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. Epigenomics 3:157-181.

- Sung JY, Goo JS, Lee DE, Jin DQ, Bizon JL, Gallagher M, Han JS (2008) Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. Learn Mem 15:183-188.
- Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoesing JM (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. Hippocampus 11:27-42.
- Swanson LW, Kohler C (1986) Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. J Neurosci 6:3010-3023.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. J Neurochem 76:1-10.

## T

- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. J Neurosci 26:7555-7564.
- Teng E, Squire LR (1999) Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. Nature 400:675-677.
- Teyler TJ, Discenna P (1984) Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. Brain Res 319:15-28.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. Ann N Y Acad Sci 983:84-100.
- Tomas Pereira I, Coletta CE, Perez EV, Kim DH, Gallagher M, Goldberg IG, Rapp PR (2012) CREB-binding protein levels in the rat hippocampus fail to predict chronological or cognitive aging. Neurobiol Aging.
- Touzani K, Marighetto A, Jaffard R (2003) Fos imaging reveals ageing-related changes in hippocampal response to radial maze discrimination testing in mice. Eur J Neurosci 17:628-640.
- Trifilieff P, Calandreau L, Herry C, Mons N, Micheau J (2007) Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and amygdala may reveal a system consolidation of contextual fear memory. Neurobiol Learn Mem 88:424-434.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J (2006) Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. Learn Mem 13:349-358.
- Tronche C, Pierard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Beracochea D (2010) Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. Neurobiol Learn Mem 93:343-351.
- Trouche S, Bontempi B, Roullet 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.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. Cell 87:1327-1338.
- Tulving E (1995) Organisation of memory: Qui vadis? In: The cognitive neurosciences (Gazzaniga MS, ed), pp 839-847. Cambridge MA: MIT Press.

Tulving E (2002) Episodic memory: from mind to brain. Annu Rev Psychol 53:1-25.

Tunur T, Dohanich GP, Schrader LA (2010) Pre-exposure to context affects learning strategy selection in mice. Learn Mem 17:328-331.

## U-V

- Uno M, Ozawa N (1991) Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. Neurosci Res 12:251-262.
- Vadnal J, Houston S, Bhatta S, Freeman E, McDonough J (2012) Transcriptional signatures mediated by acetylation overlap with early-stage Alzheimer's disease. Exp Brain Res 221:287-297.
- Valjent E, Caboche J, Vanhoutte P (2001) Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? Mol Neurobiol 23:83-99.
- 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.

- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997) Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. Science 277:376-380.
- Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. J Neurosci 27:6128-6140.
- Vetere G, Marchetti C, Benevento M, Tafi E, Marie H, Ammassari-Teule M (2011) Viralmediated expression of a constitutively active form of CREB in the dentate gyrus does not induce abnormally enduring fear memory. Behav Brain Res 222:394-396.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I (1999) Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. Behav Pharmacol 10:223-227.
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. Nature 408:495-498.
- Voronin LL (1984) [Synaptic plasticity at the levels of the archicortex and neocortex]. Neirofiziologiia 16:651-665.

## W

- Walker MP, Laferla FM, Oddo SS, Brewer GJ (2012) Reversible epigenetic histone modifications and Bdnf expression in neurons with aging and from a mouse model of Alzheimer's disease. Age (Dordr).
- Wheeler MA, Stuss DT, Tulving E (1997) Toward a theory of episodic memory: the frontal lobes and autonoetic consciousness. Psychol Bull 121:331-354.
- Whishaw IQ, Mittleman G (1986) Visits to starts, routes, and places by rats (Rattus norvegicus) in swimming pool navigation tasks. J Comp Psychol 100:422-431.
- Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB (1987) Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. Behav Brain Res 24:125-138.
- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiol Learn Mem 77:125-184.
- Winocur G (1990) Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. Behav Brain Res 38:145-154.

- Winocur G, Moscovitch M, Caruana DA, Binns MA (2005) Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. Neuropsychologia 43:1580-1590.
- Witter MP (2007) The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. Prog Brain Res 163:43-61.
- Won J, Silva AJ (2008) Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. Neurobiol Learn Mem 89:285-292.
- Wood MA, Attner MA, Oliveira AM, Brindle PK, Abel T (2006) A transcription factorbinding 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, Abel T (2005) Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. Learn Mem 12:111-119.
- Wu T, Pi EX, Tsai SN, Lam HM, Sun SM, Kwan YW, Ngai SM (2011) GmPHD5 acts as an important regulator for crosstalk between histone H3K4 di-methylation and H3K14 acetylation in response to salinity stress in soybean. BMC Plant Biol 11:178.

## X-Y-Z

- Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM (2001) A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. Science 294:2507-2511.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. Oncogene 26:5541-5552.
- Yang XJ (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. Oncogene 24:1653-1662.
- Yang XJ, Seto E (2007) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. Oncogene 26:5310-5318.
- Yang XJ, Seto E (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. Mol Cell 31:449-461.
- Yeh SH, Lin CH, Gean PW (2004) Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. Mol Pharmacol 65:1286-1292.

- Yin HH, Knowlton BJ (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. Nat Rev Neurosci 7:464-476.
- Zanger K, Radovick S, Wondisford FE (2001) CREB binding protein recruitment to the transcription complex requires growth factor-dependent phosphorylation of its GF box. Mol Cell 7:551-558.
- Zeng Y, Tan M, Kohyama J, Sneddon M, Watson JB, Sun YE, Xie CW (2011) Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. J Neurosci 31:17800-17810.
- Zola-Morgan SM, Squire LR (1990) The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. Science 250:288-290.