La neuroinflammation participe aux déficits mnésiques observés chez le rat adolescent après seulement deux intoxications à l'alcool

Deschamps C., Uyttersprot F., Vilpoux C., Naassila M., Pierrefiche O.

Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances, INSERM UMR 1247, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

1 Introduction

Nous avons démontré récemment que le *binge drinking* chez les étudiants s'accompagne d'atteintes fonctionnelles de la substance blanche associées à des déficits mnésiques notamment de la mémoire de travail spatiale (*Smith et al 2017*). Les mécanismes neurobiologiques d'action de l'éthanol (EtOH) responsables des atteintes cérébrales et mnésiques demeurent mal connus. Cependant, des études suggèrent que la neuroinflammation pourrait être impliquée et expliquer des atteintes à long terme.

Nous avons récemment rapporté, chez des rats mâles adolescents, des déficits d'apprentissage 48h après deux intoxications éthyliques de type *binge drinking* (EtOH, 3g/kg, i.p., alcoolémie ≈ 2g/L). Les mécanismes de mémorisation sont particulièrement régis au sein d'une structure cérébrale, l'hippocampe, et reposent sur la modulation à long terme de l'efficacité de transmission entre les neurones : la plasticité synaptique. Ces perturbations mnésiques observées 48h après les deux intoxications éthyliques étaient accompagnées dans l'hippocampe d'une abolition de la plasticité synaptique de type dépression à long terme (DLT) ainsi que d'une augmentation de la fonctionnalité des sous-unités GluN2B du récepteur NMDA, largement impliqué dans ce phénomène de plasticité synaptique (*Silvestre de Ferron et al., 2015*).

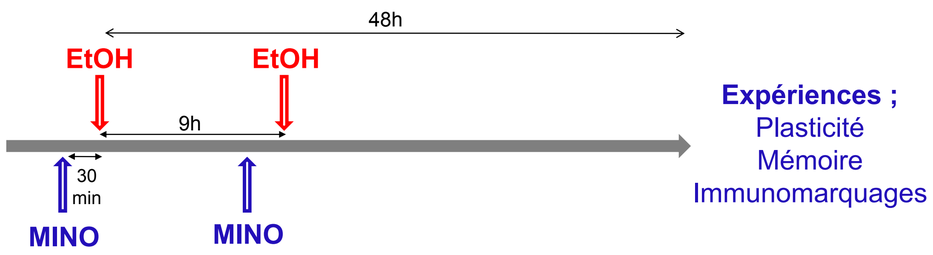
Un des mécanismes possible relayant les déficits mnésiques induits par l'EtOH serait le déclenchement d'une neuroinflammation responsable des observations précédentes. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant la minocycline, un antibiotique aux propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices, dans le but de prévenir les effets de l'EtOH dans notre modèle et avons effectué des marquages immunohistochimiques de TLR4, un récepteur impliqué dans les effets neuroinflammatoires de l'EtOH.

2 Objectif

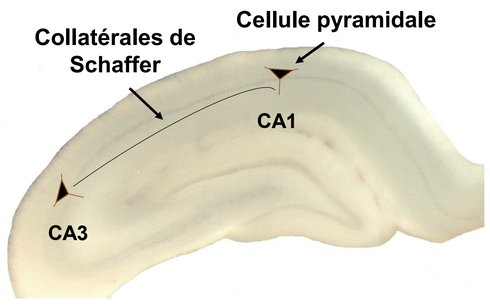
Déterminer si les mécanismes impliqués dans les effets délétères observés 48h après deux intoxications éthyliques chez le rat adolescent sont relayés par des processus neuroinflammatoires.

3 Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley (45-55 jours). Les deux intoxications éthyliques ont consisté en deux injections d'EtOH (3g/kg ; i.p.) à 9h d'intervalle. Afin de prévenir la mise en place d'une éventuelle neuroinflammation, nous avons administré au préalable un antibiotique aux propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires : la minocycline (45mg/kg ; i.p.). Toutes les expériences ont été réalisées 48h après la première intoxication éthylique.



Les immunomarquages de TLR4 et NeuN ont été réalisés dans la region CA1 de l'hippocampe. TLR4 a été marqué en rouge (Alexa Fluor 594) et NeuN en vert (Alexa Fluor 488). L'intensité d'immunofluorescence a été quantifiée à partir du logiciel ImageJ ; les performances mnésiques des animaux ont été évaluées à partir du test de reconnaissance de nouvel objet ; la plasticité synaptique a été mesurée *in vitro* sur tranches d'hippocampe dorsal, la DLT a été déclenchée par stimulation électrique basse fréquence (pLFS 200-900 à 1Hz) des synapses CA3-CA1; la taille du PPSE NMDA a été évaluée en utilisant un antagoniste, le D-AP5 et l'implication de la sous-unité GluN2B du PPSE NMDA a été appréciée en utilisant son antagoniste, le Ro25-6981.



4 Résultats

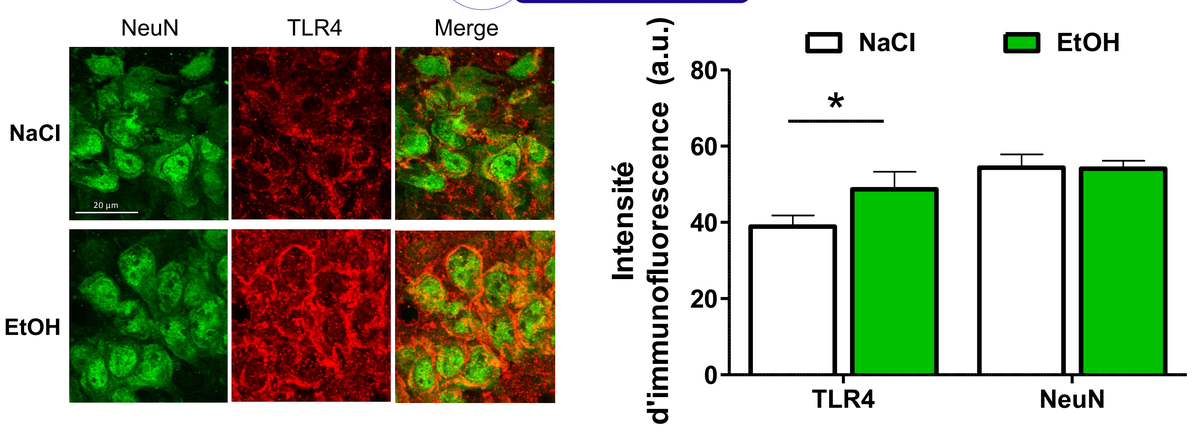


Figure 1 : Effet de deux intoxications éthyliques sur l'expression de TLR4 dans l'hippocampe

Les immunomarquages ont été réalisés dans l'aire CA1 de tranches d'hippocampe. 48h après **deux intoxications éthyliques**, l'intensité de fluorescence pour TLR4 est augmentée par rapport aux **contrôles**, sans modification de NeuN (marqueur neuronal). La superposition des images indique un marquage membranaire sur les cellules pyramidales de CA1.

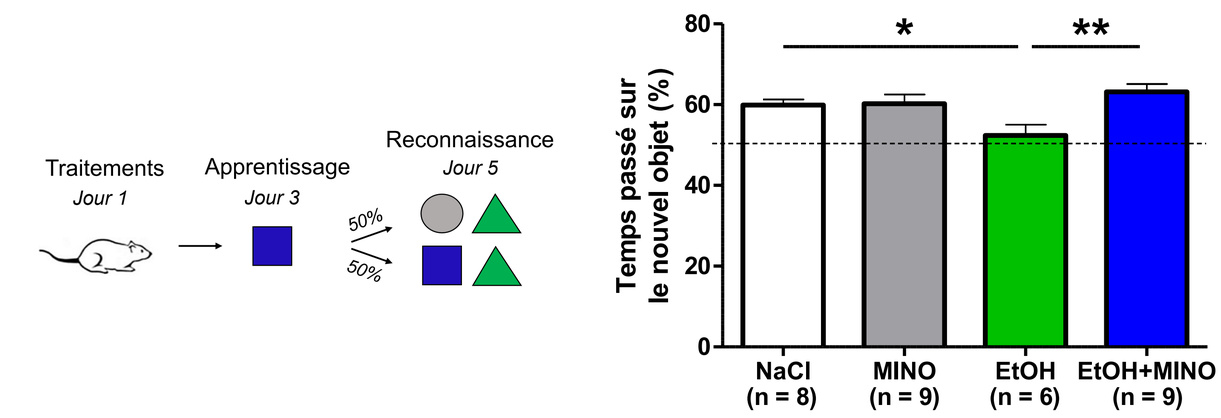


Figure 2 : Effect de la minocycline sur les déficits mnésiques induits 48h après les deux intoxications éthyliques

Nous mesurons le temps passé sur chaque objet et l'exprimons en pourcentage de temps passé sur le nouvel objet (▲) par rapport au temps total d'exploration (■/●+▲). Les animaux **contrôles** passent plus de la moitié du temps sur le nouvel objet et la **minocycline, lorsqu'elle est administrée seule**, n'affecte pas le ratio d'exploration. En revanche, 48h après **deux intoxications éthyliques**, les animaux passent un temps equivalent à explorer l'objet nouveau et l'objet familier, suggérant un deficit d'apprentissage. De façon intéressante, la **minocycline, lorsqu'elle est administrée 30min avant l'EtOH**, prévient ce deficit d'apprentissage.

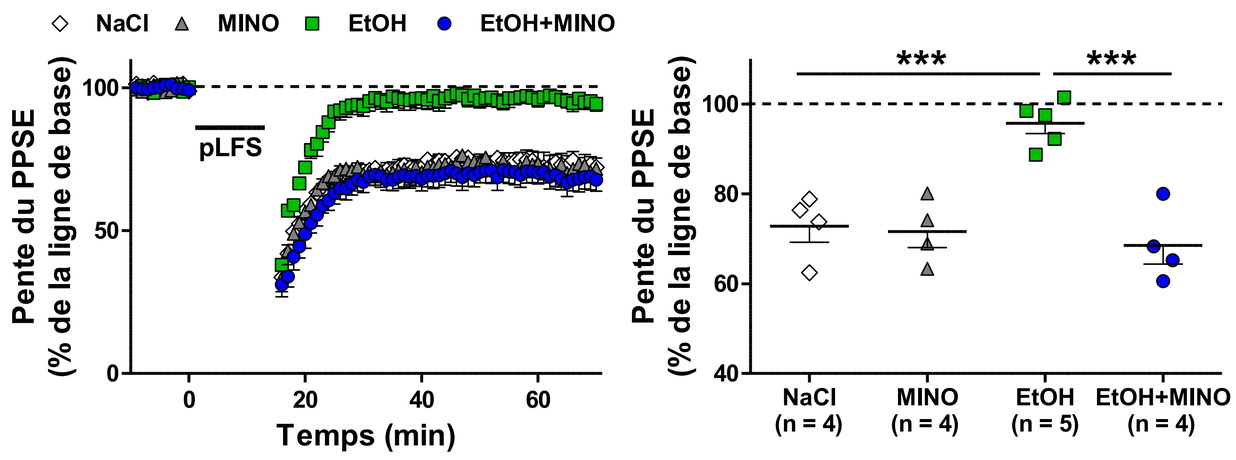


Figure 3 : Effet de la minocycline sur l'abolition de la dépression à long terme induite par l'éthanol après 48h

Les tranches **contrôles** présentent une DLT, la **minocycline seule** ne modifie pas l'amplitude de la DLT par rapport aux contrôles. 48h après **deux intoxications éthyliques**, la DLT est abolie, et cette abolition est prévenue par l'administration **préalable de minocycline**.

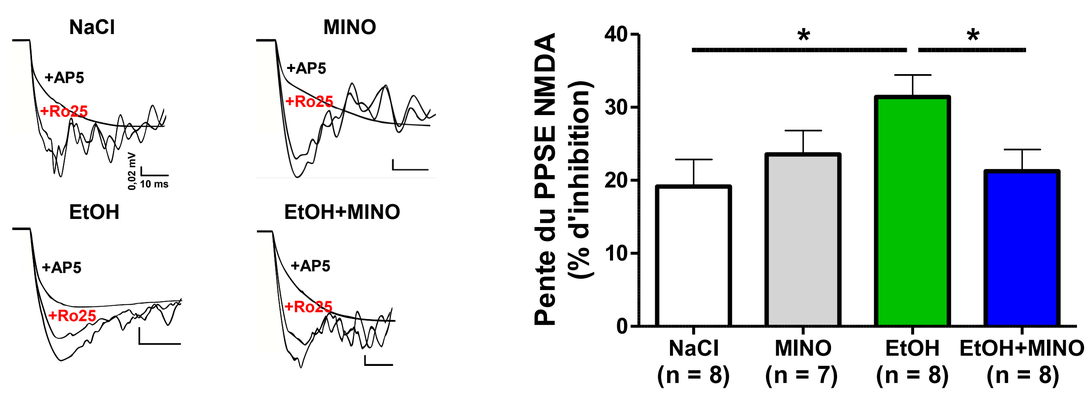


Figure 4 : Effet de la minocycline sur la sensibilité pharmacologique du PPSE NMDA à un antagoniste de la sous-unite GluN2B après deux intoxications éthyliques

En présence de l'antagoniste de la sous-unite GluN2B du récepteur NMDA, la pente du PPSE diminue de environ 20% chez les tranches **contrôles**. La **minocycline seule** ne modifie pas ce pourcentage d'inhibition. De manière intéressante, le pourcentage d'inhibition du PPSE NMDA est significativement augmenté chez les tranches **EtOH**, et la **minocycline administrée 30min avant l'EtOH** prévient cette augmentation.

5 Conclusion

Nos résultats révèlent l'implication d'une neuroinflammation dans les effets délétères observés après 48h sur les processus d'apprentissage et de plasticité synaptique dans l'hippocampe suite à deux intoxications éthyliques de type *binge drinking* chez le rat adolescent. Bloquer la mise en place de tels processus ouvre des perspectives intéressantes dans la prévention des déficits mnésiques chez les *binge drinkers*.

Ce poster a été présenté lors des Journées de la Société Française d'Alcoologie 2020

Cette étude est financée par :

Silvestre de Ferron, B., Bennouar, K.-E., Kervern, M., Alaux-Cantin, S., Robert, A., Rabiant, K., Antol, J., Naassila, M., and Pierrefiche, O. (2015). Two Binges of Ethanol a Day Keep the Memory Away in Adolescent Rats: Key Role for GLUN2B Subunit. Int. J. Neuropsychopharmacol.19 . PMID: 26254123
Smith, K. W.; Gierski, F.; Andre, J.; Dowell, N. G.; Cercignani, M.; Naassila, M.; Duka, T. Altered White Matter Integrity in Whole Brain and Segments of Corpus Callosum, in Young Social Drinkers with Binge Drinking Pattern. Addict Biol 2017, 22 (2), 490–501.PMID 26687067