



HAL
open science

Rôle de la protéine phosphatase 1 dans les mécanismes d'action de la cocaïne et implication des modifications épigénétiques dans sa régulation

Sarah Pol Bodetto

► To cite this version:

Sarah Pol Bodetto. Rôle de la protéine phosphatase 1 dans les mécanismes d'action de la cocaïne et implication des modifications épigénétiques dans sa régulation. Pharmacologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ101 . tel-01017176

HAL Id: tel-01017176

<https://theses.hal.science/tel-01017176>

Submitted on 2 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE STRASBOURG



ED 414 Sciences de la Vie et de la Santé
UMR 7237 Uds/CNRS

THESE présentée par

Sarah POL BODETTO

Soutenue le 23 octobre 2012

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Spécialité **Neurosciences**

**Rôle de la protéine phosphatase 1
dans les mécanismes d'action de la cocaïne
et implication des modifications épigénétiques dans sa régulation.**

THESE dirigée par :

M. ANGLARD Patrick

DR2, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DAVAL Jean-Luc

M. ROUX Jean-Christophe

DR1, Université Henri Poincaré, Nancy 1

CR1, Université de la Méditerranée
Aix-Marseille II

EXAMINATEUR INTERNE :

M. BARROT Michel

DR2, Université de Strasbourg

Je tenais en premier lieu à remercier le Dr Christian Kelche de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire si chaleureux, dans lequel il fait bon travailler.

J'adresse également d'immenses remerciements au Dr Jean Zwiller pour m'avoir acceptée dans son équipe. Merci mille fois Jean pour ton soutien, tes conseils et ta disponibilité. Merci d'avoir toujours trouvé du temps à me consacrer et d'avoir su me communiquer ton enthousiasme inconditionnel pour la Science. Merci pour tous ces moments où tu m'as écoutée et encouragée, aussi bien sur un plan scientifique que plus personnel.

Je remercie vivement les Dr Jean-Luc Daval, Jean-Christophe Roux et Michel Barrot d'avoir accepté de prendre de leur temps afin de juger mon travail de thèse.

Je remercie bien évidemment mon directeur de thèse, le Dr Patrick Anglard, pour m'avoir encadrée tout au long de ces trois années et pour m'avoir tout appris sur les techniques de biologie moléculaire. Je vous remercie sincèrement pour votre implication, tout particulièrement pendant cette dernière ligne droite. Merci pour tous vos conseils et vos encouragements, même lorsque les expériences ne donnaient aucun résultat. Merci de m'avoir poussée à m'accrocher et de m'avoir guidée dans la bonne direction. Merci aussi de m'avoir acceptée telle que je suis, avec mon caractère et mes humeurs.

Merci également à tous les membres de l'équipe pour leur gentillesse et leur bonne humeur, sans qui ces trois années auraient été beaucoup moins agréables. Merci à Pascal pour m'avoir dévoilé tous les secrets de l'implantation de cathéter dans la veine jugulaire, de l'auto-administration de cocaïne et des prélèvements de structures cérébrales. Merci pour ta disponibilité, ton soutien et tes conseils, ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble. Merci également à Jean-Bernard, Marie-Odile et Herrade pour nos discussions au coin de la paillasse. Je n'oublie pas non plus les doctorants et post-doctorants de l'équipe que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces trois années. Merci à Delphine pour m'avoir initiée aux joies de la ChIP et de la qPCR, à Lionel pour toutes nos discussions, à Elodie bien sûr pour tous ces bons moments passés ensemble et pour les mille et uns rebondissements vécus lors de chacune des conférences de vulgarisation scientifique. Merci aussi à Matthieu pour sa bonne humeur et pour son aide au cours des premières séances d'auto-administration. Je n'oublie évidemment pas Carolina. Merci pour ton aide si précieuse au cours de ces derniers mois, merci pour ta joie de vivre, tes conseils et ton soutien.

J'adresse également de vifs remerciements à l'ensemble des membres du LINC espla pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur soutien. Un merci tout particulier à Monique et Alexandra pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide dans la mise en place du protocole de conditionnement opérant à la nourriture. Un grand merci également à Karin et Brigitte, pour leur disponibilité, leur aide et leurs conseils.

Un immense merci à tous les doctorants et post-doctorants du LINC espla pour avoir rendu ces années de thèse si agréables. Merci à tous pour tous ces moments de complicité et tous ces éclats de rire. Je remercie tout particulièrement Marc-Antoine, pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin, pour m'avoir écoutée quand j'avais besoin de me confier et pour avoir toujours su me faire rire aux moments où je m'y attendais le moins. Merci aussi à Olivier et Anne pour nos petits repas à la cafétéria. Merci à Michaël pour avoir parsemé ces trois années d'innombrables blagues, plus ou moins réussies, je dois bien l'avouer. Merci aux deux JB pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier Yannick, Alexis et Denise pour m'avoir accueillie dans leur bureau au cours de ma première année de thèse, pour avoir su me remonter le moral et me motiver, et pour encore deux ans après, toujours trouver le temps pour un petit café.

Je n'oublie pas non plus Lorène avec qui j'ai passé de si bons moments. Ni Christophe et Anne-So, que j'ai toujours plaisir à revoir, malgré le peu d'occasions. Et bien sûr, PH et Léa, pour leurs encouragements, leur soutien et leur disponibilité. Merci à vous deux pour toutes ces soirées où l'on a tant rigolé.

Un grand merci à tous les gens du master avec qui je me suis si bien entendue et qui restent toujours présents tout au long de ses années. Je pense tout particulièrement à Laetitia, Alexandre et Romain.

Je remercie bien évidemment tous mes proches, famille et amis, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenue. Merci d'avoir compris mon manque de disponibilité et de ne pas m'en avoir tenu rigueur. Je vous promets de me rattraper !

Enfin, du plus profond de mon cœur je remercie Romain, pour avoir été là pour moi tout au long de cette dernière ligne droite. Merci pour ton soutien inconditionnel, ta patience à toute épreuve et ton aide. Merci de m'avoir tant bichonnée, tout particulièrement ces derniers temps, d'avoir su me faire rire, même dans les moments les plus pénibles, et de ne m'avoir jamais laissée tomber. Sans toi, cette période aurait été nettement moins agréable. Pour tout ça, et bien plus encore, un immense merci...

LISTE DES PUBLICATIONS

Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, *et al.* (2011). The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res* **218**: 138-151.

Pol Bodetto S, Carouge D, Dietrich JB, Zwiller J, Anglard P. Cocaine represses Protein Phosphatase-1C β through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain. *Article soumis*.

Pol Bodetto S, Romieu P, Coelho CT, Majchrzak M, Barbelivien A, Zwiller J, Anglard P. Protein phosphatase-1C β is differentially regulated in response to natural reinforcers or drugs of abuse. *Article en préparation*.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Pol Bodetto S, Cosquer B, Herbeaux K, Cassel JC, Jeltsch-David H. Recent vs remote retrieval and c-Fos expression in rats tested in a novel memory task. *Neurex Annual Meeting, Strasbourg, 19 juin 2009*.

Pol Bodetto S, Carouge D, Zwiller J, Anglard P. Protein Phosphatase-1 repression by cocaine is mediated by Methyl-CpG Binding Protein-2 (MeCP2) in adult brain. *10^e Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, 24-27 mai 2011*.

Pol Bodetto S, Carouge D, Dietrich JB, Zwiller J, Anglard P. Cocaine down-regulates Protein Phosphatase-1 through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 (Mecp2) recruitment in adult rat brain. *The 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelone, 14-18 juillet 2012*.

5caC : 5-carboxylcytosine	DARPP-32 : '32-kDa dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein'
5fC : 5-formylcytosine	DAT : Transporteur membranaire de la dopamine
5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine	Daza : 5-aza-2'-déoxycytidine
5hmU : 5-hydroxyméthyluracile	DG : Gyrus denté
5-HT : Sérotonine	DNMT : 'DNA methyltransferases' ou ADN méthyltransférases
5mC : 5-méthylcytosine	Domaine 'RVXF' : R, arginine ; V, valine ; X, n'importe quel acide aminé ; F, phénylalanine
5mU : 5-méthyluracile	DSM-IV : 'Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders'
AA : Auto-administration	Egr : 'Early growth response'
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate	GABA : Acide γ -aminobutyrique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ou AMP cyclique	Glu : Glutamate
Arg : Arginine	HAT : Histones acétyltransférases
BER : 'Base excision repair'	HDAC : Histones déacétylases
CA : Cornes d'Ammon	HDM : Histone déméthylases
Ca²⁺ : Ions calcium	HMT : Histones méthyltransférases
Ca²⁺/CaMK ou CaMK : 'Calcium calmoduline kinase'	i.p. : intrapéritonéale
Cdk5 : 'Cyclin-dependent kinase 5'	i.v. : intraveineuse
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine	I1 : Inhibiteur 1
CK1 : Protéine caséine kinase I	I2 : Inhibiteur 2
CK2 : Protéine caséine kinase II	IP3 : Inositol-triphosphate
COMT : Catéchol-O-méthyl-transférases	JMJ : Histones déméthylases à domaine Jumonji
CpG : Dinucléotide Cytosine/Guanine	K⁺ : Ions potassium
CPu : Caudé-putamen	L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine
CREB : 'cAMP responsive element binding protein'	LTD : Dépression à long terme
CxCg : Cortex cingulaire	LTP : Potentialisation à long terme
CxPF : Cortex préfrontal	Lys : Lysine
DA : Dopamine	

MAO : Monoamine oxydases	PP1Cα : Sous-unité catalytique α de la protéine phosphatase 1
MAP : ‘ <i>Microtubules-associated protein</i> ’	PP1Cβ : Sous-unité catalytique β de la protéine phosphatase 1
MBD : ‘ <i>Methyl binding domain</i> ’	PP1Cγ : Sous-unité catalytique γ de la protéine phosphatase 1
MBD1, 2, 3, 4 : ‘ <i>Methyl Binding Domain protein 1, 2, 3, 4</i> ’	PP2 : Protéine phosphatase de type 2
MeCP2 : ‘ <i>Methyl-CpG binding protein 2</i> ’	PP2A : Protéine phosphatase 2A
Mg²⁺ : Ions magnésium	PP2B : Protéine phosphatase 2B ou Calcineurine
miR-132 : ‘ <i>microRNA-132</i> ’	PP2C : Protéine phosphatase 2C
Mn²⁺ : Ions manganèse	PR : Ratio progressif
MSK : ‘ <i>Mitogen- and Stress-activated kinase</i> ’	SAM : S-adénosyl-L-méthionine
Mypts : ‘ <i>Myosine phosphatase targeting subunits</i> ’	Ser : Sérine
NA : Noradrénaline	SERT : Transporteur membranaire de la sérotonine
Na⁺ : Ions sodium	Sirt : Sirtuines
NAc : Noyau accumbens	SN : Substance noire
NAcC : Partie ‘ <i>Core</i> ’ du Noyau accumbens	SNc : Partie compacte de la Substance noire
NAcS : Partie ‘ <i>Shell</i> ’ du Noyau accumbens	SNr : Partie réticulée de la Substance noire
NET : Transporteur membranaire de la noradrénaline	SP1 : ‘ <i>Specific protein 1</i> ’
NIPP1 : ‘ <i>Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1</i> ’	Tet : ‘ <i>Ten-eleven translocation</i> ’
NLS : ‘ <i>Nuclear Localisation Signal</i> ’	TH : Tyrosine hydroxylase
NMDA : N-méthyl-D-aspartate	Thr : Thréonine
NP : ‘ <i>Nose poke</i> ’	TRD : ‘ <i>Transcriptional Repressor Domain</i> ’
NPa : ‘Nose poke’ dans l’orifice actif	Tyr : Tyrosine
PKA : Protéine kinase A	UTR : ‘ <i>Untranslated Region</i> ’
PKC : Protéine kinase C	VMAT : Transporteurs vésiculaires des monoamines
PLC : Phospholipase C	VTA : Aire tegmentale ventrale
PP : Protéine phosphatase	Xist : ‘ <i>X inactive specific transcript</i> ’
PP1 : Protéine phosphatase de type 1	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du chlorhydrate de cocaïne	7
Figure 2 : Catabolisme de la cocaïne	9
Figure 3 : Théorie des processus opposants	16
Figure 4 : Théorie de la dérégulation de l'homéostasie ou théorie de l'allostasie	17
Figure 5 : Principe de l'auto-administration	22
Figure 6 : Voies dopaminergiques dans l'encéphale de Rat	25
Figure 7 : Biosynthèse de la dopamine	26
Figure 8 : Schéma bilan de l'ensemble des récepteurs dopaminergiques et des voies intracellulaires associées	30
Figure 9 : Action de la cocaïne sur le transporteur DAT de la dopamine	31
Figure 10 : Voies sérotoninergiques dans l'encéphale de Rat	34
Figure 11 : Biosynthèse de la sérotonine	35
Figure 12 : Schéma bilan de l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques et des voies intracellulaires associées	36
Figure 13 : Schéma bilan des interactions dopamine/glutamate/GABA dans le système des ganglions de la base	45
Figure 14 : Evolution de la taille des épines dendritiques et du nombre de récepteurs AMPA membranaires suite à un traitement chronique par la cocaïne et à une période de sevrage	50

Figure 15 : Représentation des îlots CpG au niveau de la région promotrice de chacun des trois gènes <i>PP1Cα</i> , <i>PP1Cβ</i> et <i>PP1Cγ</i> de Rat	55
Figure 16 : Triple alignement des séquences d'acides aminés des isoformes <i>PP1Cα</i> , β et γ de Rat	56
Figure 17 : Structure cristallographique des sous-unités catalytiques de PP1	57
Figure 18 : Localisations des sous-unités catalytiques β et γ 1 de PP1 dans l'encéphale de Rat	61
Figure 19 : Structure de la neurabine/spinophiline	64
Figure 20 : Complexes PP1/neurabines et PP1/yotiao et régulation des récepteurs NMDA	66
Figure 21 : Organisation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA et des complexes impliqués dans sa régulation	67
Figure 22 : PP1 et plasticité synaptique	69
Figure 23 : Régulation schématique de la liaison de phospho-DARPP-32 à PP1	72
Figure 24 : Représentation schématique des sites de phosphorylation de DARPP-32	74
Figure 25 : Modulation des interactions DARPP-32/PP1 par les différents systèmes de neurotransmission	75
Figure 26 : Interactions DARPP-32/PP1 et régulation de l'état de phosphorylation de nombreux effecteurs physiologiques au sein des neurones épineux de taille moyenne du striatum	77
Figure 27 : Représentation schématique du nucléosome	86
Figure 28 : Représentation schématique des différents stades de compaction de l'ADN	87
Figure 29 : Passage d'un état de compaction à un autre <i>via</i> des mécanismes épigénétiques	88
Figure 30 : Mécanismes épigénétiques impliqués dans le remodelage de la chromatine	89
Figure 31 : Réaction de méthylation de l'ADN	90

Figure 32 : Illustration schématique de la répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN	91
Figure 33 : Structure du gène <i>MeCP2</i> et de ses deux transcrits	92
Figure 34 : Régulation de la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé <i>via</i> la phosphorylation des résidus Sérine 80 et 421	95
Figure 35 : Mécanisme de répression transcriptionnelle dépendant de MeCP2	96
Figure 36 : Répression transcriptionnelle <i>via</i> la liaison de MeCP2 aux nucléosomes	97
Figure 37 : Processus d'inactivation du chromosome X	99
Figure 38 : Mécanismes mis en jeu dans la déméthylation de l'ADN	101
Figure 39 : Illustration schématique des principales modifications post-traductionnelles des histones	102
Figure 40 : Réaction d'acétylation des histones et enzymes impliquées	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères de la dépendance selon le DSM-IV-TR	13
Tableau 2 : Critères de la dépendance selon la CIM-10	14
Tableau 3 : Partenaires régulateurs de PP1	59-60

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : COCAÏNE, CERVEAU ET DEPENDANCE.....	5
I. Généralités.....	7
A. Origine de la cocaïne et évolution de sa consommation	7
B. Pharmacocinétique de la cocaïne.....	8
II. Effets somatiques de la cocaïne.....	10
A. Activité anesthésique locale	10
B. Toxicité au niveau cérébral.....	10
C. Toxicité cardio-vasculaire	11
D. Toxicité pulmonaire	11
III. Effets psychotropes de la cocaïne.....	11
A. Chez l'Homme	11
1. Administration aiguë	11
2. Administration chronique et abus	12
3. Dépendance	12
3.1. <i>Diagnostic</i>	13
3.2. <i>Facteurs de vulnérabilité</i>	14
3.3. <i>Théories de la dépendance</i>	15
3.3.1. Théorie du renforcement positif et négatif	15
3.3.2. Théorie des processus opposants / Théorie de l'allostase	15
3.3.3. Limites des théories précédentes	17
3.3.4. Théorie de l'apprentissage aberrant	17
3.3.5. Théorie de la sensibilisation de la motivation	19
B. Chez le Rat.....	20
1. Administration aiguë	21
2. Administration chronique et sensibilisation comportementale	21
3. Auto-administration de cocaïne et modélisation de la dépendance	21
IV. Systèmes de neurotransmission impliqués dans les effets psychotropes de la cocaïne	23
A. Système dopaminergique	24
1. Présentation générale.....	24
1.1. <i>Voies dopaminergiques</i>	24
1.2. <i>Métabolisme de la dopamine</i>	26
1.3. <i>Transporteurs de la dopamine</i>	27
1.4. <i>Récepteurs de la dopamine et transduction du signal</i>	28
1.4.1. Famille D1.....	28
1.4.2. Famille D2.....	29
2. Effets de la cocaïne sur le système dopaminergique.....	31
2.1. <i>Action de la cocaïne sur le transporteur DAT de la dopamine</i>	31
2.2. <i>Action de la cocaïne sur les récepteurs dopaminergiques</i>	32
B. Système sérotoninergique.....	33
1. Présentation générale.....	34
1.1. <i>Voies sérotoninergiques</i>	34
1.2. <i>Métabolisme de la sérotonine</i>	34
1.3. <i>Récepteurs de la sérotonine et transduction du signal</i>	35
2. Effets de la cocaïne sur le système sérotoninergique.....	36

C. Système noradrénergique	37
1. Présentation générale.....	37
1.1. Voies noradrénergiques	37
1.2. Métabolisme de la noradrénaline	38
1.3. Récepteurs de la noradrénaline et transduction du signal	38
2. Effets de la cocaïne sur le système noradrénergique.....	38
D. Système glutamatergique	39
1. Présentation des récepteurs AMPA et NMDA.....	39
2. Interactions dopamine/glutamate dans le système de récompense	40
3. Effets de la cocaïne sur le système glutamatergique.....	41
E. Système GABAergique.....	42
1. Présentation des récepteurs GABAergiques	43
2. Interactions dopamine/GABA dans le système de récompense.....	43
3. Effets de la cocaïne sur le système GABAergique	45
V. Plasticité induite par la cocaïne.....	46
A. Plasticité structurale induite par la cocaïne	46
B. Plasticité synaptique induite par la cocaïne	46
1. Plasticité synaptique dans l'aire tegmentale ventrale et cocaïne.....	47
2. Plasticité synaptique dans le noyau accumbens et cocaïne	48
C. Corrélation entre plasticité structurale et plasticité synaptique	49
CHAPITRE 2 : PROTEINE PHOSPHATASE 1, PLASTICITE ET COCAÏNE	51
I. Présentation de la sérine/thréonine protéine phosphatase 1.....	54
A. Sous-unités catalytiques de PP1	54
B. Partenaires régulateurs de PP1	57
II. Localisations des différentes sous-unités catalytiques de PP1 dans l'encéphale de mammifères.....	61
A. Localisations cellulaires des différentes isoformes de PP1	61
B. Localisations subcellulaires des différentes isoformes de PP1	62
III. PP1 et plasticité cérébrale	63
A. PP1 et plasticité structurale	63
1. Implication de PP1 dans la régulation des épines dendritiques	63
2. PP1, stabilité des microtubules et maintien de la structure des cellules	64
B. PP1 et plasticité synaptique	65
1. PP1 et régulation des récepteurs NMDA du glutamate.....	65
2. PP1 et potentialisation à long terme	66
3. PP1 et dépression à long terme	68
4. PP1 et dépotentialisation	70
IV. PP1, striatum et cocaïne	70
A. Interactions DARPP-32/PP1 et intégration de multiples systèmes de neurotransmission	70
1. Phosphorylation de la Thréonine 34 de DARPP-32 et inhibition de PP1	71
2. Liaison PP1/phospho-DARPP-32 (Thréonine 34)	72
3. Régulation des interactions PP1/DARPP-32 par phosphorylation de résidus Sérine de DARPP-32.....	73
4. Phosphorylation de la Thréonine 75 de DARPP-32 et inhibition de la PKA	73
5. Conséquences physiologiques de l'interaction PP1/DARPP-32.....	76

B. Interactions DARPP-32/PP1 et cocaïne	78
1. Effets d'un traitement aigu vs chronique par la cocaïne sur la phosphorylation de la Thréonine 34 vs 75 de DARPP-32	78
2. Apports des souris dont le gène DARPP-32 a été invalidé	78
3. Rôle spécifique de la phosphorylation de chacun des résidus Thréonine 34 et 75 de DARPP-32 dans les effets de la cocaïne.....	79
V. PP1 et mémoire	80
CHAPITRE 3 : COCAÏNE, MODIFICATIONS EPIGENETIQUES ET PP1	83
I. Chromatine et compaction de l'ADN.....	86
II. Modifications épigénétiques	88
A. Méthylation de l'ADN.....	89
1. Généralités.....	89
2. Présentation d'une protéine de liaison à l'ADN méthylé : MeCP2	91
2.1. Généralités	91
2.2. Régulation de l'expression du gène MeCP2	94
2.3. Régulation de la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé.....	95
2.4. MeCP2 et régulation de la transcription	96
3. Méthylation de l'ADN : modification stable mais néanmoins réversible.....	98
3.1. Méthylation de l'ADN et expression tissu-spécifique	98
3.2. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale	98
3.3. Méthylation de l'ADN et inactivation du chromosome X	98
3.4. Déméthylation de l'ADN	100
B. Modifications post-traductionnelles des histones.....	101
1. Acétylation des histones.....	102
2. Phosphorylation des histones	103
3. Méthylation des histones.....	104
III. PP1 et modifications épigénétiques	105
IV. Transmission des modifications épigénétiques.....	106
V. Plasticité des modifications épigénétiques.....	107
A. Modifications épigénétiques : 'mémoire' de l'expérience individuelle.....	107
B. Modifications épigénétiques et cocaïne.....	109
1. Modifications post-traductionnelles des histones et cocaïne	110
2. Méthylation de l'ADN et cocaïne	112
OBJECTIFS DE THESE	115
CONTRIBUTION EXPERIMENTALE	119
ARTICLE 1 :	
<i>Cocaine represses Protein Phosphatase-1Cβ through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain.....</i>	121

ARTICLE 2 :

Protein Phosphatase-1C β is differentially regulated in response to natural reinforcers or drugs of abuse 167

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....213

I. Différentes isoformes de PP1, différents rôles dans la biologie cellulaire 215

II. PP1, méthylation de l'ADN et cocaïne..... 217

A. Méthylation des îlots CpG..... 217

B. MeCP2, répresseur de la transcription..... 220

C. Cocaïne et méthylation de l'ADN 222

III. Répression de PP1C β et amplification des effets de la cocaïne 223

IV. PP1, cocaïne et mémoire..... 226

V. Drogues et récompenses naturelles 229

CONCLUSION GENERALE231

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....233

INTRODUCTION GENERALE

La consommation abusive de drogues pose non seulement un problème majeur de santé publique, mais est également à la base d'enjeux internationaux, en particulier en ce qui concerne la cocaïne. On note en effet en Europe une augmentation constante du trafic de cocaïne, mais également de sa consommation et des décès liés à une surdose de cocaïne.

De nombreuses études ont cherché à identifier les mécanismes neuronaux impliqués dans les effets à long-terme des drogues. Néanmoins, en dépit d'avancées considérables, on ignore encore les processus qui mènent une minorité de consommateurs réguliers à basculer dans la dépendance, caractérisée par une consommation compulsive de drogue, indépendante de leur volonté. Il est cependant établi que la consommation répétée de drogue induit des phénomènes de plasticité dans les structures du système de récompense. Ces phénomènes étant persistants, ils pourraient de ce fait participer aux effets à long-terme des drogues et être impliqués dans la dépendance.

La protéine phosphatase de type 1 (PP1) est une sérine/thréonine protéine phosphatase fortement exprimée dans l'encéphale de mammifères. Du fait de la variété des partenaires régulateurs auxquels chacune de ses quatre sous-unités catalytiques peut s'associer, elle est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires, et notamment dans les processus de plasticité cérébrale. PP1 se situe en outre au cœur des voies de signalisation mises en jeu dans le striatum par l'activation des récepteurs D1 de la dopamine et des récepteurs NMDA du glutamate. PP1 est par conséquent susceptible de participer aux effets immédiats mais également à long-terme de la cocaïne.

Du fait de son rôle dans les phénomènes de plasticité cérébrale, PP1 est également impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Elle est en effet considérée comme un régulateur négatif de la mémoire. PP1 pourrait donc contribuer à la mémorisation et au rappel des souvenirs liés à la drogue, ainsi qu'au développement et au maintien des habitudes induites par la consommation répétée de drogue.

Des données antérieures de notre équipe obtenues par la technique des '*microarrays*' ont permis d'identifier 147 gènes différentiellement régulés par la cocaïne, dont le gène *PP1C β* codant la sous-unité catalytique β de PP1. Le travail présenté dans ce manuscrit s'intéresse à la régulation de l'expression du gène *PP1C β* par la cocaïne et à son implication

dans les effets de la cocaïne. Compte tenu du rôle de PP1 dans l'apprentissage et la mémoire, la régulation du gène *PP1C β* a également été évaluée dans un test de conditionnement opérant, l'auto-administration intraveineuse de cocaïne.

Bien que les drogues, tout comme les récompenses naturelles, activent le système de récompense, elles induisent par ailleurs des neuroadaptations plus spécifiques du type de renforçateur considéré. Un second objectif de ce travail de thèse a donc consisté à comparer les effets de la cocaïne et ceux d'une récompense naturelle, la nourriture, sur la régulation de l'expression du gène *PP1C β* .

L'expression des gènes est contrôlée par divers processus, dont les modifications épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques régulent la transcription des gènes en induisant un remodelage de la chromatine. Ils sont dynamiquement régulés par l'expérience individuelle et sous-tendent, dans certains cas, des modifications stables et durables de l'expression des gènes. Ces modifications sont donc susceptibles de rendre compte des effets à long-terme des drogues et de participer aux neuroadaptations durables induites par l'exposition répétée aux drogues, à l'origine de la dépendance.

Notre équipe a démontré que différentes modifications épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN, sont régulées par la cocaïne. Nous nous sommes par conséquent intéressés à l'implication de ces mécanismes épigénétiques, et plus particulièrement à la méthylation de l'ADN, dans la régulation de l'expression du gène *PP1C β* par la cocaïne.

Ce manuscrit se divise en trois parties. Dans une première partie, les données de la littérature permettant de cerner le contexte scientifique du travail de thèse seront présentées. Nous nous intéresserons ainsi en premier lieu à la cocaïne, à son action au niveau cérébral et à la dépendance, puis à PP1, et enfin aux régulations épigénétiques. Dans une seconde partie, les données expérimentales obtenues au cours de la thèse seront exposées sous la forme de deux articles. Une discussion générale des résultats clôturera ce manuscrit et énoncera les perspectives de recherche dégagées par ce travail de thèse.

CHAPITRE 1

COCAÏNE, CERVEAU ET DEPENDANCE

CHAPITRE 1

COCAÏNE, CERVEAU ET DEPENDANCE

I. Généralités

A. Origine de la cocaïne et évolution de sa consommation

La cocaïne appartient à la classe des psychostimulants, dans laquelle on trouve également les amphétamines substituées, la nicotine ou encore la caféine.

La cocaïne est un alcaloïde extrait de la feuille de coca de l'arbuste *Erythroxylum coca*. La 'khoca' ('arbre par excellence' en langue aymara) a été cultivée bien avant l'Empire Inca. Cette plante, alors vénérée par les sociétés andines, était utilisée lors de rituels religieux (Lebeau, 2006). La feuille de coca était également réputée pour ses propriétés anesthésiques et utilisée lors d'interventions chirurgicales (trépanation par exemple). Consommées sous forme orale (chique), les feuilles de coca présentent des propriétés anorexigènes et permettent également de se protéger des effets de l'altitude.

Les premiers spécimens furent décrits en 1750 par De Jussieu et la plante fut nommée *Erythroxylum coca* par Lamarck en 1786. En 1855, Geadcke distilla le résidu sec d'un extrait de coca et obtint un produit cristallin, l'« Erythroxylin ». En 1860, le chimiste Niemann purifia un alcaloïde des feuilles de coca qu'il nomma cocaïne (Niemann, 1860), dont la formule chimique fut déterminée trois ans plus tard par Lossen.

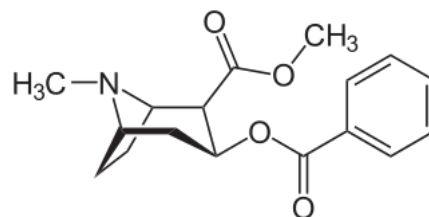


Figure 1 :
Structure du chlorhydrate de cocaïne

L'usage de la cocaïne dans le domaine médical prit rapidement un essor considérable, du fait notamment de ses propriétés d'anesthésique local. Ses propriétés stimulantes furent parallèlement redécouvertes et utilisées pour créer différentes boissons stimulantes. On peut citer le vin Mariani, commercialisé en 1863, et qui contenait de fortes doses de cocaïne, puis le Coca-Cola, boisson élaborée en 1885 par John Pemmington, à base d'extraits de feuilles de coca, source de cocaïne, et d'extraits de noix de cola, source de caféine.

Un nouveau mode de consommation consistant à inhaler la poudre de cocaïne fit son apparition à la même époque. C'est en 1884 que Freud publia son célèbre article '*Über Coca*', dans lequel il décrivait les effets bénéfiques de la cocaïne (Freud, 1884). Dès 1885, les premiers cas de toxicité et de dépendance furent décrits, phénomène qui ne fit que prendre de l'ampleur jusqu'au début des années 1900. On parle de 'première épidémie de consommation de cocaïne'. Les Etats-Unis furent les premiers à mettre en place des restrictions vis-à-vis de la consommation de la cocaïne (Pure Food Act, 1906 ; Harrison Narcotic Act, 1914). En France, il fallut attendre 1916 pour qu'une liste de stupéfiants soit établie et qu'une loi prohibant l'usage des drogues soit mise en place. On nota une deuxième épidémie de consommation de cocaïne dans les années 1970, largement amplifiée dans les années 1980 par l'émergence du '*crack*', forme amine libre de la cocaïne ('*free base*') insoluble dans l'eau mais pouvant être fumée.

Depuis 1977, on note en Europe une augmentation constante du trafic de cocaïne, mais également de sa consommation et des décès liés à une surdose de cocaïne. Selon l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies, l'expérimentation de la cocaïne aurait triplé entre 1992 et 2005 chez les 18-44 ans. Ce constat pose non seulement un problème de santé publique majeur, mais également des enjeux internationaux, la cocaïne étant l'une des substances illicites les plus consommées à travers le monde.

B. Pharmacocinétique de la cocaïne

La cocaïne peut être administrée de différentes manières. Elle peut être consommée par voie orale (ingestion), mode de consommation traditionnel des peuples andins. Dans les pays occidentaux, la cocaïne est plus couramment 'sniffée' sous forme de poudre, injectée par voie intraveineuse (i.v.) ou encore fumée sous forme de '*crack*'.

Les pics plasmatiques de cocaïne sont fonction de la dose et du mode d'administration (Haddah et Winchester, 1990), ce qui explique que les effets ressentis sont différents entre

l'ingestion de la cocaïne sous forme de feuille de coca mâchée et son inhalation sous forme de 'crack' par exemple. En effet, lorsque la cocaïne est administrée par voie orale (ingestion), l'activité de la drogue est réduite, celle-ci étant détruite de 70 à 80% lors d'un premier passage hépatique (Gold et Balster, 1992). L'élévation de la concentration sanguine en cocaïne est lente, le pic plasmatique étant obtenu au bout de 50 à 90 minutes (Clarke, 1986). Lors d'une administration par voie nasale (poudre), la cocaïne pénètre dans la circulation sanguine au niveau de la muqueuse nasale. Les effets sont ressentis plus rapidement, le pic plasmatique étant atteint en 15 minutes. Lors d'une injection par voie i.v., le pic plasmatique survient au bout de quelques dizaines de secondes seulement. La survenue du pic plasmatique est encore plus rapide lors d'une inhalation de vapeurs de cocaïne ('crack'). La cocaïne franchissant la membrane alvéolaire pulmonaire, les effets surviennent en quelques secondes. Ils sont beaucoup plus intenses ('flash') que ceux ressentis suite à une injection i.v., mais sont de courte durée (Clarke, 1986).

La demi-vie plasmatique de la cocaïne varie selon les sujets et les espèces. Chez le Rat et la Souris, celle-ci est relativement courte et varie de 12 à 18 minutes (Ma et coll., 1999 ; Benuck et coll., 1987), alors que chez l'Homme, elle s'étend de 40 à 90 minutes (Barnett, 1981). La cocaïne est en effet rapidement dégradée dans l'organisme, notamment sous l'action d'estérases hépatiques et plasmatiques. Les voies de dégradation de la cocaïne, ainsi que ses métabolites, sont présentés dans la figure ci-dessous.

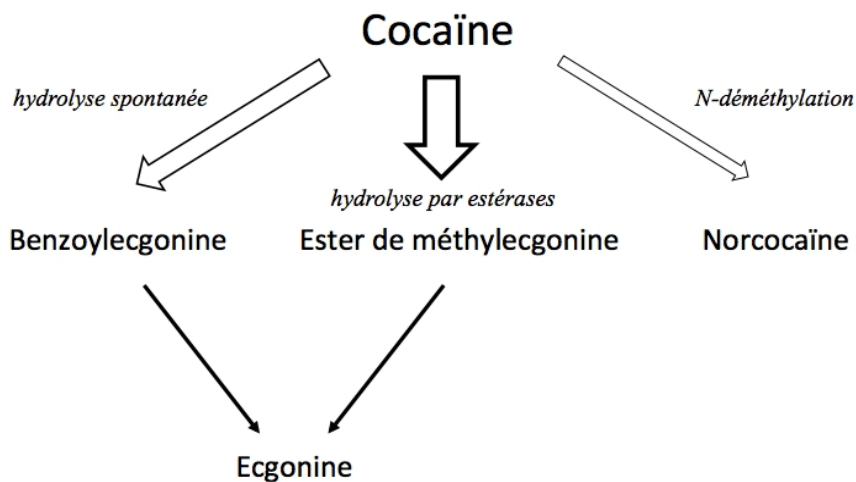


Figure 2 : Catabolisme de la cocaïne

Les estérases hépatiques et plasmatiques hydrolysent la cocaïne en ester de méthylécgonine. Par hydrolyse spontanée, la cocaïne peut être transformée en benzoylécgonine. L'ester de méthylécgonine et la benzoylécgonine sont dégradés en ecgonine. Il existe également une voie mineure de dégradation qui aboutit à la norcocaïne suite à une réaction de N-déméthylation.

II. Effets somatiques de la cocaïne

Suite à une consommation de cocaïne, le sujet ressent une sensation de bien-être et d'euphorie, un sentiment de toute-puissance et une amélioration de ses capacités intellectuelles, de son acuité mentale et de sa vigilance. Cependant, la consommation de cocaïne n'affecte pas uniquement le fonctionnement du système nerveux central. Elle perturbe également, entre autres, les systèmes cardio-vasculaire et respiratoire. Ses activités d'anesthésique local sont par ailleurs connues depuis l'Empire Inca.

A. Activité anesthésique locale

La cocaïne, tout comme ses analogues de synthèse actuellement utilisés en médecine dont la lidocaïne, inhibe de manière rapide et réversible les canaux sodiques voltage-dépendants (Crumb et Clarkson, 1990). En pénétrant à l'intérieur du canal, elle empêche en effet l'influx d'ions sodium dans les cellules musculaires et nerveuses. Elle agit notamment au niveau des fibres nociceptives A δ et C.

B. Toxicité au niveau cérébral

La prise de cocaïne peut provoquer une désynchronisation de l'activité électrique. Elle abaisse par ailleurs le seuil épileptogène, ce qui explique que sa consommation s'accompagne souvent de convulsions. Elle peut également causer des céphalées, des hémorragies cérébro-méningées, des ischémies cérébrales ou encore une hyperthermie, cette dernière étant plus particulièrement observée chez les usagers du '*crack*'. Lors d'une consommation répétée, on peut également noter des altérations de la circulation sanguine cérébrale (Volkow et coll., 1992), des accidents cérébro-vasculaires (Lichtenfeld et coll., 1984 ; Wojak et Flamm, 1987), voire dans certains cas, une atrophie cérébrale diffuse (Pascual-Leone et coll., 1991). L'usage répété de cocaïne peut également entraîner des ataxies, voire des troubles de l'expression verbale et de la mémorisation (Ardila et coll., 1991). Ces troubles persistent, même plusieurs semaines après l'arrêt de la consommation de cocaïne. On peut cependant noter une certaine récupération fonctionnelle dans des cas d'abstinence prolongée (Ardila et coll., 1991).

C. Toxicité cardio-vasculaire

La cocaïne affecte particulièrement le système cardio-vasculaire (pour revue : Knuepfer et coll., 2003). Elle provoque une activation puissante du système nerveux autonome sympathique et induit ainsi une augmentation des taux plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline (NA), ce qui exacerbe encore l'effet du système nerveux autonome sympathique (Jain et coll., 1990 ; Sofuoglu et coll., 2001). Ceci se traduit alors par une tachycardie, l'apparition fréquente d'arythmies, voire une ischémie myocardique (Chakko , 2002). La prise de cocaïne provoque également une forte vasoconstriction de la plupart des lits vasculaires et est associée à un risque élevé d'infarctus du myocarde.

D. Toxicité pulmonaire

La consommation de cocaïne induit une hypertension artérielle au niveau pulmonaire. On note par ailleurs l'apparition de pneumothorax et d'hémorragies alvéolaires, ainsi qu'une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (Gold et Balster, 1992). Lors d'une intoxication aiguë, un œdème du poumon peut également se former et se développer rapidement, ce qui peut conduire, dans les cas les plus fulgurants, à un décès en seulement quelques heures.

III. Effets psychotropes de la cocaïne

Après avoir décrit les principaux effets somatiques de la cocaïne, nous développerons dans un premier temps les effets psychotropes observés lors d'une prise aiguë vs chronique de cocaïne chez l'Homme. Nous aborderons ensuite les principaux effets observés chez le Rat, modèle d'étude utilisé au cours de la thèse.

A. Chez l'Homme

1. Administration aiguë

Suite à une prise occasionnelle de cocaïne, le sujet se sent rapidement envahi d'une profonde euphorie et d'une sensation de bien-être, qui peuvent être mêlées à un sentiment d'invincibilité et à une confiance en soi accrue. Ces effets sont accompagnés d'un accroissement de la vigilance, d'une amélioration de l'acuité mentale et des capacités

physiques, ainsi que d'une diminution de la sensation de fatigue, de l'appétit et du sommeil (Resnick et coll., 1977 ; Javard et coll., 1978 ; Newton et coll., 2005). Cette phase est qualifiée de '*rush*' ou de '*flash*' et est décrite parfois comme étant de type orgasmique.

2. Administration chronique et abus

Les effets particulièrement plaisants ressentis lors de la prise de cocaïne en font un puissant renforçateur positif et incitent le consommateur à renouveler l'expérience. Lorsque les prises se succèdent sur une période brève, l'arrêt de la consommation induit chez le sujet une phase de '*crash*'. L'individu ressent alors une forte fatigue et une lassitude, associées à de l'anxiété, et dans certains cas, à une dépression (Newton et coll., 2005).

Chez certains individus, on observe progressivement une accélération de la fréquence des prises et une augmentation des quantités consommées, ce qui conduit à une phase d'abus. L'abus est défini comme une consommation excessive engendrant des dommages somatiques, psychoaffectifs ou sociaux, soit pour le sujet lui-même, soit pour son environnement.

Il est intéressant de noter que bien souvent la transition de l'usage récréatif et contrôlé à l'usage abusif de la drogue, ou à la dépendance, ne sont pas perçus par le consommateur qui pense, lui, au contraire, maîtriser sa consommation.

3. Dépendance

Certains consommateurs réguliers basculent dans la dépendance. Celle-ci est caractérisée par une consommation compulsive de la drogue, indépendante de la volonté du sujet, et ce, en dépit de la conscience des conséquences négatives pour l'individu et/ou son entourage. Lors de l'arrêt de la consommation, des symptômes de sevrage apparaissent. Dans le cas de la cocaïne, ceux-ci sont proches d'un épisode de psychose aiguë : anxiété, dysphorie, délires, troubles du sommeil, agressivité, agitation motrice (Koob et Bloom, 1988). Ce mal-être caractéristique du sevrage pousse bien souvent l'individu à consommer à nouveau la substance (phénomène de rechute). Il est important de préciser que même lorsque le sujet arrive à maintenir son abstinence pendant de longues périodes, notamment grâce à un soutien de son entourage et à un suivi psychologique, il est toujours possible d'observer des phénomènes de rechute. Un stress ou une réexposition à la drogue et/ou au contexte environnemental dans lequel l'individu avait l'habitude de la consommer sont autant de facteurs susceptibles de réenclencher une consommation régulière de la substance.

3.1. Diagnostic

Le diagnostic de dépendance est établi sur les critères issus du DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 2000 ; Tableau 1) et de la CIM-10 (Classification statistique Internationale des Maladies et des problèmes de santé connexes, Organisation Mondiale de la Santé, 1992 ; Tableau 2). Ces critères ne sont pas spécifiques d'une substance psychoactive donnée.

Tableau 1 : **Critères de la dépendance selon le DSM-IV-TR**

Mode d'utilisation inadapté d'une substance (ici la cocaïne) conduisant à une altération du fonctionnement ou une souffrance, cliniquement significative, caractérisée par la présence de trois ou plus des manifestations suivantes, à un moment quelconque d'une période continue d'un an :

1. Tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :
 - * Besoin de quantités notablement plus fortes de la substance pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré
 - * Effet notablement diminué en cas d'utilisation continue d'une même quantité de la substance.
2. Sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :
 - * Syndrome de sevrage caractéristique de la substance
 - * La même substance (ou une substance très proche) est prise pour soulager ou éviter des symptômes de sevrage
3. La substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus prolongée que prévu.
4. Il y a un désir persistant, ou des efforts infructueux, pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance.
5. Beaucoup de temps est passé à des activités nécessaires pour obtenir la substance, à utiliser le produit ou à récupérer de ses effets.
6. Des activités sociales, professionnelles ou de loisirs importantes sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance.
7. L'utilisation de la substance est poursuivie bien que la personne sache avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par la substance.

DSM-IV-TR : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – Revision IV (American Psychiatric Association, 2000)

Tableau 2 : Critères de la dépendance selon le CIM-10

Ensemble de phénomènes comportementaux, cognitifs et physiologiques dans lesquels l'utilisation d'une substance psychoactive spécifique (ici la cocaïne) ou d'une catégorie de substances entraîne un désinvestissement progressif des autres activités. La caractéristique essentielle du syndrome de dépendance consiste en un désir, souvent puissant, parfois compulsif. Au cours des rechutes, c'est-à-dire après une période d'abstinence, le syndrome de dépendance peut se réinstaller beaucoup plus rapidement qu'initialement.

Pour un diagnostic de certitude, au moins trois des manifestations suivantes doivent habituellement avoir été présentes en même temps au cours de la dernière année.

- * Désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psychoactive.
- * Difficultés à contrôler l'utilisation de la substance (début ou interruption de la consommation ou niveaux d'utilisation).
- * Syndrome de sevrage physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation, comme en témoignent la survenue d'un syndrome de sevrage caractéristique de la substance ou l'utilisation de la même substance (ou d'une substance apparentée) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.
- * Mise en évidence d'une tolérance aux effets de la substance psychoactive, le sujet a besoin d'une quantité plus importante de la substance pour obtenir l'effet désiré.
- * Abandon progressif d'autres sources de plaisir et d'intérêts au profit de l'utilisation de la substance psychoactive, et augmentation du temps passé à se procurer la substance, la consommer ou récupérer de ses effets.
- * Poursuite de la consommation de la substance malgré la survenue de conséquences manifestement nocives.

CIM-10 : Classification internationale des maladies et des problèmes de santé connexes (Organisation Mondiale de la Santé, 1992)

3.2. Facteurs de vulnérabilité

Plusieurs paramètres peuvent prédisposer un individu à développer une dépendance.

Concernant les facteurs de susceptibilité d'ordre génétique, la présence d'allèles particuliers de certains gènes est associée à une augmentation des risques de développer une dépendance vis-à-vis d'une drogue. Par exemple, la présence de certains allèles codant le récepteur 1 des cannabinoïdes (CB1) augmente la probabilité de développer une dépendance à l'alcool (Comings et coll., 1997).

Le risque de développer une dépendance est également lié à la sensibilité propre de l'individu. En effet, l'état émotionnel et mental du sujet, la présence de pathologies psychiatriques, son âge ou encore sa propension à rechercher de nouvelles sensations sont autant de facteurs qui influencent la probabilité de développer une dépendance.

L'environnement social de l'individu participe aussi au risque de développer une dépendance. Le stress est l'un des facteurs de vulnérabilité les plus importants. Une vie en marge de la société, l'absence de soutien familial ou encore la survenue d'événements traumatisants (deuil, rupture conjugale, licenciement, abus sexuel...) augmentent également la probabilité de consommer une ou plusieurs drogues et constituent des facteurs de risque de développer, à terme, une dépendance.

3.3. Théories de la dépendance

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer la transition progressive d'une consommation contrôlée de la drogue à la dépendance (pour revue : Robinson et Berridge, 2003).

3.3.1. Théorie du renforcement positif et négatif

Selon cette théorie, les drogues seraient initialement consommées pour le plaisir qu'elles procurent (Wise, 1996). Le renforcement positif engendré par la drogue inciterait l'individu à en renouveler l'expérience. Cependant, la répétition des prises induirait des processus neuroadaptatifs, conduisant à une diminution des effets plaisants (tolérance) et progressivement à la dépendance, ainsi qu'à l'apparition de symptômes de sevrage lors de l'arrêt de la consommation. Les symptômes de sevrage étant particulièrement déplaisants, la consommation compulsive de drogue serait alors maintenue pour éviter les effets négatifs et le mal-être lié au sevrage (Koob et Bloom, 1988).

3.3.2. Théorie des processus opposants / Théorie de l'allostasie

La théorie des processus opposants, tout comme la précédente, est fondée sur le fait que la drogue serait initialement consommée pour ses effets plaisants, puis pour éviter les effets du sevrage. Proposée par Solomon et Corbit en 1974, cette théorie postule que la consommation de drogue activerait de manière dose-dépendante un processus plaisant ('a') dans les circuits de la récompense, qui en retour déclencherait l'activation d'un processus négatif ou opposé ('b'), visant à restaurer l'homéostasie cérébrale. L'état ressenti par l'individu serait défini par la somme de ces deux processus. Lors des premières prises de la drogue, les effets plaisants seraient majoritaires, ce qui induirait un ressenti particulièrement agréable, les effets liés au sevrage étant minimes. Cependant, au fur et à mesure de la

répétition des prises, les effets négatifs s'amplifieraient, alors que les effets plaisants resteraient identiques, voire diminueraient en intensité (phénomène de tolérance). Par conséquent, l'expérience ressentie par l'individu deviendrait peu à peu majoritairement dominée par les symptômes déplaisants, notamment liés au sevrage. L'état de dépendance résulterait donc de la mise en place de processus neuroadaptatifs visant à s'opposer aux effets de la consommation de la drogue, et qui induiraient *in fine* une dérégulation massive de l'homéostasie hédonique du système nerveux central.

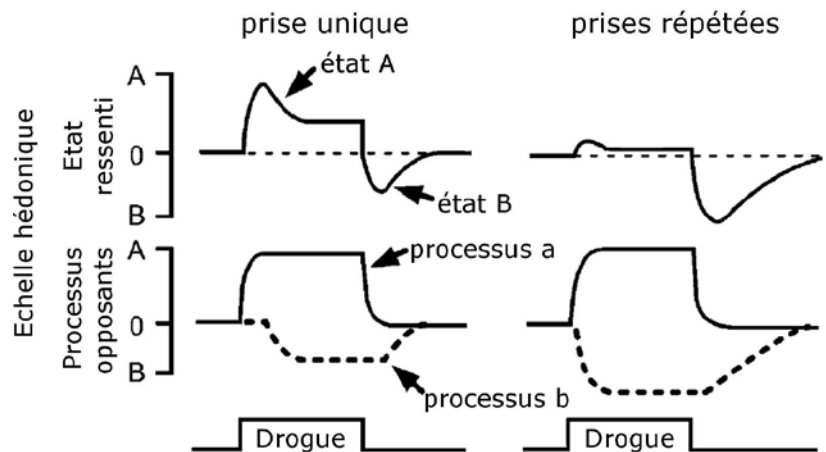


Figure 3 : **Théorie des processus opposants**

La consommation de drogue active un processus plaisant 'a' dans les circuits de la récompense, qui en retour déclenche l'activation d'un processus négatif ou opposé 'b', visant à rétablir l'homéostasie. L'état ressenti est défini par la somme des processus 'a' et 'b'. Cet état est appelé 'A' lorsque l'effet ressenti est plaisant, et 'B' lorsque celui-ci est déplaisant. Lors des premières prises de drogue, l'état A est important, alors que l'état B est réduit. Au fur et à mesure de la répétition des prises et de l'installation de la dépendance, le processus 'b' s'amplifie (amplitude, durée), alors que le processus 'a' reste identique, voire diminue en intensité, ce qui conduit à un état B majoritaire, extrêmement anhédonique (*adaptée de Solomon et Corbit, 1974*).

Les bases neuroanatomiques et neurochimiques de la théorie des processus opposants ont été proposées par Koob et Le Moal en 1997. Le renforcement positif (processus 'a') serait causé par l'activation de la voie dopaminergique mésolimbique vers le noyau accumbens (NAc) et l'amygdale, alors que le renforcement négatif (processus 'b') serait dû à l'activation des voies du stress (activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien ou axe corticotrope ou axe HPA, '*hypothalamo-pituitary axis*') (Koob et Le Moal, 1997). La transition vers une consommation compulsive, et donc vers la dépendance, résulterait d'une dérégulation de ces deux systèmes. Au fur et à mesure de la répétition des prises, la libération

de dopamine (DA) diminuerait, induisant un renforcement positif plus faible (tolérance), alors que la libération d'hormones du stress comme la corticolibérine ('*corticotropin releasing factor*', CRF) augmenterait, ce qui favoriserait alors le renforcement négatif. Il y aurait donc progressivement une diminution des effets plaisants de la drogue (à la fois en intensité et en durée), et au contraire, une augmentation des effets négatifs liés au sevrage, ce qui aboutirait à une dérégulation de l'homéostasie hédonique ou allostasie.

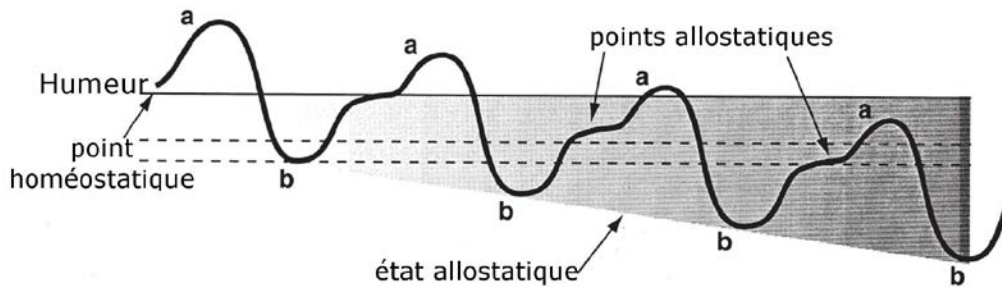


Figure 4 : **Théorie de la dérégulation de l'homéostasie ou théorie de l'allostasie**

Selon cette théorie, le processus 'b' n'a jamais la possibilité de retourner à son état homéostatique originel entre les différentes prises de drogues, ce qui aboutit à une dérégulation de l'homéostasie et à l'apparition d'un état allostatique de plus-en-plus anhédonique (*adaptée de Koob et Le Moal, 2001*).

3.3.3. Limites des théories précédentes

Le point faible majeur de ces théories réside dans le fait qu'elles ne permettent pas d'expliquer la rechute, lorsque celle-ci a lieu après de longues périodes d'abstinence. En effet, selon ces théories, la rechute serait précipitée par le mal-être lié au sevrage. Or, les symptômes de sevrage sont les plus forts dans les deux jours qui suivent l'arrêt de la consommation, alors que la susceptibilité de rechute et de 'réinstallation' du comportement compulsif est, elle, encore particulièrement importante pendant des semaines, voire des mois (Grimm et coll., 2001 ; Shalev et coll., 2001). Il n'est en effet pas rare de voir un individu rechuter des mois, voire des années après l'arrêt des symptômes de sevrage, alors même que selon les théories précédemment citées, le processus 'b' devrait être retourné à la normale, et l'individu devrait donc être guéri de sa dépendance.

3.3.4. Théorie de l'apprentissage aberrant

Cette théorie a émergé du constat que l'exposition répétée aux drogues facilite certaines formes d'apprentissage (Harmer et Phillips, 1998 et 1999) et qu'elle est capable

d'induire, dans les neurones impliqués dans la récompense, des processus neuroadaptatifs similaires à ceux observés lors d'un apprentissage (Hyman et Malenka, 2001). Certains chercheurs ont de ce fait proposé que la transition vers la dépendance résulterait d'un apprentissage aberrant (Tiffany, 1990 ; O'Brien et coll., 1992 ; White, 1996 ; Robbins et Everitt, 1999 ; Di Chiara, 1999 ; Berke et Hyman, 2000 ; Everitt et coll., 2001 ; Hyman et Malenka, 2001). Les drogues induiraient des associations anormalement fortes au sein des processus impliqués dans l'apprentissage de la récompense, qui seraient bien plus puissantes que celles observées dans des conditions physiologiques, dans le cas de récompenses naturelles.

Une première hypothèse serait qu'un apprentissage déclaratif (explicite) anormalement fort pourrait contribuer à la dépendance. En effet, les drogues pourraient soit rendre particulièrement puissants les souvenirs conscients du plaisir ressenti lors de la prise, soit modifier les souvenirs déclaratifs du consommateur de sorte que ses attentes vis-à-vis de la drogue deviennent excessivement optimistes. Dans les deux cas, ces souvenirs seraient faux et entraîneraient une prédiction erronée des conséquences de la prise de drogue. Cette théorie ne semble cependant pas illustrer les propos des patients dépendants. Ces derniers n'ont, en général, pas d'attente démesurée des effets provoqués par la prise de drogue et sont souvent d'accord pour dire que l'usage de la drogue n'est pas justifié par le plaisir qu'ils éprouvent.

Une autre possibilité est que les drogues causeraient un apprentissage implicite anormalement fort, l'hypothèse la plus connue étant celle de l'automatisation des associations stimulus-réponse. Selon cette théorie, la transition vers la dépendance résulterait du basculement d'un comportement conscient et planifié vers un comportement plus automatique, déclenché par un stimulus qui lui est associé. Lors des premières prises, la consommation de drogue serait consciente et planifiée. Puis, au fur et à mesure de la répétition des prises et de l'installation progressive de la dépendance, il y aurait une transition vers un comportement procédural, c'est-à-dire automatique. La drogue serait alors consommée non plus de manière consciente et planifiée, mais par 'mauvaise habitude', suite à l'exposition à certains indices environnementaux associés à la drogue (Robbins et Everitt, 1999). Au niveau neuroanatomique, cette transition serait associée à une modification des connections dopaminergiques. En effet, le contrôle exercé par le cortex préfrontal (CxPF) lors d'une décision consciente et planifiée serait progressivement remplacé par la mise en jeu du striatum dorsal au niveau du caudé-putamen (CPu), impliqué dans les processus d'apprentissage procédural (Everitt et Robbins, 2005). Cette hypothèse permet certes

d'expliquer les rituels pratiqués par les usagers dépendants lors de la consommation de la drogue, mais elle peine à justifier le caractère compulsif de cette consommation. Par ailleurs, cette théorie ne permet pas non plus d'expliquer les comportements complexes mis en œuvre par un patient dépendant afin de se procurer la drogue. Ceux-ci ne sont en aucun cas 'automatiques', mais sont, au contraire, conscients et extrêmement flexibles, puisqu'ils dépendent à chaque fois de la situation à laquelle l'individu est confronté pour obtenir sa drogue.

3.3.5. Théorie de la sensibilisation de la motivation

Selon cette théorie, proposée par Robinson et Berridge en 1993, on peut dissocier la valeur hédonique ('liking') que procure la drogue de sa valeur motivationnelle ('wanting'), puisque ces deux valeurs n'impliquent pas les mêmes réseaux neuronaux. La valeur hédonique serait, entre autres, sous-tendue par la neurotransmission opioïde du NAc, alors que la valeur motivationnelle dépendrait, elle, du système dopaminergique (Berridge, 2003 ; Berridge et Robinson, 1998). La transition vers la dépendance s'accompagnerait d'une sensibilisation persistante du système dopaminergique contrôlant la valeur motivationnelle, ces réseaux devenant hypersensibles aux effets spécifiques de la drogue et aux stimuli associés. Une valeur motivationnelle excessive serait alors attribuée aux représentations liées à la drogue, ce qui causerait une envie irrésistible de la consommer ('craving') et conduirait à un comportement compulsif de recherche et de prise de drogue (Robinson et Berridge, 1993 et 2000).

Il est par ailleurs intéressant de noter que l'exposition chronique aux drogues induit une altération du fonctionnement des régions fronto-corticales, régions impliquées dans les processus exécutifs comme la prise de décision et la capacité à émettre des estimations sur les conséquences d'une action (Balleine et Dickinson, 1998 ; Smith et Jonides, 1999 ; Bechara et coll., 2000 ; pour revue : Jentsch et Taylor, 1999). Ceci est notamment illustré par le fait que certains patients dépendants présentent des déficits neuropsychologiques similaires à ceux observés chez les patients souffrant de dysfonctionnement frontal (Bolla et coll., 1998 ; Jentsch et Taylor, 1999 ; Robbins et Everitt, 1999, Rogers et coll., 1999). Ces déficits fronto-corticaux induits par l'exposition répétée à la drogue contribuent de manière importante aux décisions prises par les patients vis-à-vis de leur consommation. La diminution d'activité du cortex préfrontal pourrait également induire une augmentation de l'activité des systèmes dopaminergiques sous-corticaux (Carlsson et coll., 2001 ; Jackson et coll., 2001 ; Meyer-

Lindenberg et coll., 2002). Ainsi, le dysfonctionnement fronto-cortical pourrait non seulement entraîner une faible capacité de jugement et de prise de décision, mais également exacerber la sensibilisation motivationnelle.

La théorie de la sensibilisation de la motivation est particulièrement intéressante parce qu'elle permet d'expliquer par exemple les cas de rechute survenant après de longues périodes d'abstinence. En effet, les circuits dopaminergiques attribuant la valeur motivationnelle étant sensibilisés de manière persistante, une valeur motivationnelle excessive serait toujours attribuée aux représentations liées à la drogue, même des mois ou des années après l'arrêt de sa consommation. De ce fait, la présence d'un indice lié à la drogue provoquerait chez l'individu abstinent une envie irrésistible de consommer la drogue et donc la rechute, et ce malgré sa volonté de maintenir son abstinence et l'absence de symptômes de sevrage. Cette théorie permet également d'expliquer pourquoi des patients dépendants consomment une substance alors même qu'ils sont conscients de l'effet limité que leur procurera leur consommation. Selon cette théorie, la consommation de drogue serait en effet causée par une valeur motivationnelle excessive attribuée aux représentations liées à la drogue et non par la valeur hédonique intrinsèque de la drogue.

Nous avons vu que la cocaïne est un puissant renforçateur positif, ce qui pousse bien souvent l'individu à renouveler son expérience avec la drogue. Chez certains consommateurs, la répétition des prises peut progressivement mener à l'installation de la dépendance, caractérisée entre autres par une consommation compulsive de la drogue, indépendante de la volonté du sujet. Qu'en est-il chez le rongeur ? Quels sont les principaux effets psychotropes de la cocaïne ? Peut-on observer, comme chez l'Homme, l'apparition progressive de comportements de type addictifs ?

B. Chez le Rat

La cocaïne peut être administrée à l'animal de manière non-contingente, suite à une injection intra-péritonéale (injection i.p.) par exemple, mais elle peut aussi être consommée volontairement par l'animal, de manière contingente, comme c'est le cas dans le dispositif de l'auto-administration (AA).

1. Administration aigue

On observe des effets différents selon la dose de cocaïne administrée. Dans le cas d'une faible dose de cocaïne, on note une augmentation de l'activité locomotrice et exploratoire. Par contre, l'administration d'une forte dose de cocaïne induit des stéréotypies, peut provoquer des convulsions et éventuellement conduire à la mort de l'animal (Johanson et Fischman, 1989 ; Witkin et Goldberg, 1990).

2. Administration chronique et sensibilisation comportementale

L'injection répétée d'une même dose de cocaïne induit une augmentation graduelle de l'activité locomotrice et des stéréotypies (Post et coll., 1987 ; Kalivas et coll., 1988 ; Pierce et Kalivas, 1997). On parle alors de sensibilisation comportementale. Ce phénomène peut encore être observé des mois, voire des années après l'arrêt des injections de cocaïne (Paulson et coll., 1991 ; Castner et Goldman-Rakic, 1999). La sensibilisation comportementale reflète donc la mise en place de processus neuroadaptatifs persistants, induits par l'exposition répétée à la cocaïne.

3. Auto-administration de cocaïne et modélisation de la dépendance

L'AA permet d'étudier les propriétés renforçantes des drogues, qui se manifestent par un comportement actif de l'animal afin d'obtenir la drogue. L'administration de la drogue renforce la réponse de l'animal de manière contingente, ce qui induit l'acquisition d'un comportement permettant de déclencher de nouvelles administrations de la drogue. Dans le cas de l'AA de cocaïne, un cathéter est préalablement implanté dans la veine jugulaire droite de l'animal, permettant une administration i.v. de la drogue lorsque celui-ci appuie sur un levier (*'lever press'*) ou introduit son museau dans un orifice (*'nose poke'*, NP). Ce levier ou cet orifice sont appelés levier/orifice actif. Un second levier/orifice est également présent dans la chambre d'AA, mais n'est associé à aucune conséquence, quel que soit le comportement de l'animal. Ce second levier/orifice est de ce fait qualifié d'inactif. La présence de ce levier/orifice inactif permet notamment de s'assurer que l'animal est capable de discriminer le levier/orifice actif du levier/orifice inactif. En effet, une fois le comportement d'AA stabilisé, les animaux effectuent en général plus de 90% de leurs actions au niveau du levier/orifice actif. Afin d'éviter d'éventuels surdosages, chaque injection i.v. de cocaïne est suivie d'une période réfractaire au cours de laquelle il est impossible pour l'animal d'obtenir une injection

supplémentaire de drogue, et ce, malgré des appuis sur le levier actif ou des NP dans l'orifice actif. Celle-ci est signalée à l'animal et sa durée peut varier de 20 à 60 secondes. Des stimuli environnementaux (comme une lumière ou un son par exemple) sont souvent associés à l'injection i.v. de la drogue. Ces stimuli gagnent progressivement une valeur motivationnelle suite à la mise en place de processus d'apprentissage associatif. Ils permettent d'une part une discrimination plus rapide du levier/orifice actif par rapport au levier/orifice inactif, et d'autre part, une visualisation de l'impact d'un environnement particulier sur l'acquisition du comportement d'AA, la phase de sevrage et la rechute.

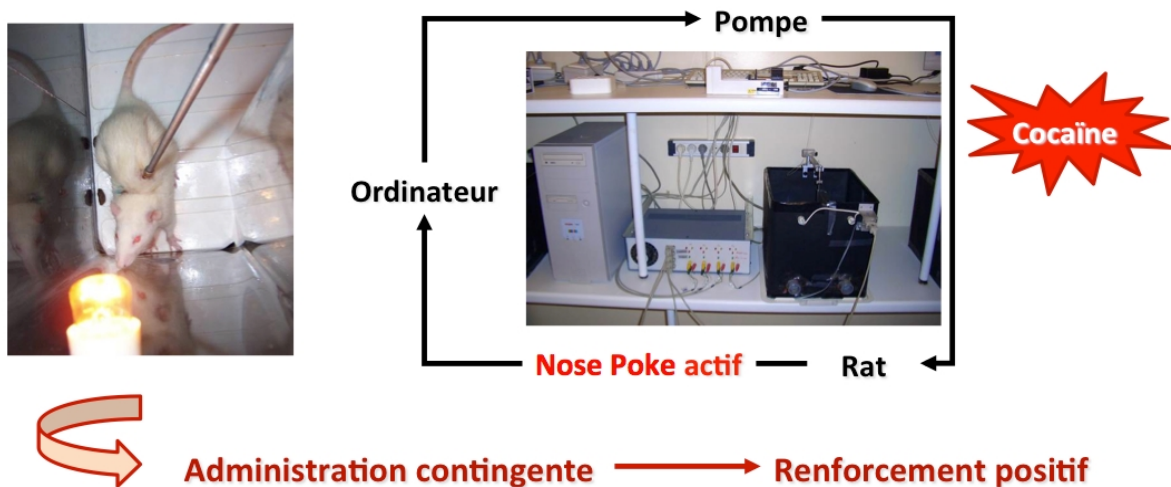


Figure 5 : Principe de l'auto-administration

L'utilisation de protocoles particuliers d'AA de cocaïne permet d'observer la mise en place, chez certains individus uniquement, d'un comportement qui peut être assimilé à de la dépendance (Deroche-Gamonet et coll., 2004). Ces protocoles visent notamment à modéliser les 3 critères du DSM-IV les plus importants pour poser le diagnostic de dépendance et sont conduits sur de longues périodes afin de laisser le temps à d'éventuels comportements de type addictif de se développer.

Critères modélisés :

- (i) **Le sujet a des difficultés à stopper sa consommation de drogue ou à limiter sa prise de drogue.** Pour modéliser ce critère, les auteurs ont mesuré la persistance du comportement de recherche de cocaïne durant des périodes où la drogue n'était pas disponible.

- (ii) *Le sujet présente une motivation extrêmement forte pour consommer la drogue, ses activités étant focalisées sur la recherche et la prise de la drogue.* Ce critère a été modélisé à l'aide d'un protocole de ratio progressif (PR), c'est-à-dire un protocole dans lequel le nombre de NP à effectuer pour obtenir une injection ultérieure augmente progressivement au cours de la session, selon un algorithme déterminé, généralement exponentiel, et ce, jusqu'à ce que l'animal arrête de répondre (Richardson et Roberts, 1996). On considère que le nombre de NP nécessaires à l'obtention de la dernière injection avant que l'animal n'arrête de répondre (point de rupture) est un bon indice de l'effort consenti par l'animal pour obtenir la drogue et qu'il reflète donc sa motivation pour la drogue.
- (iii) *La drogue est consommée malgré la connaissance des conséquences néfastes.* Pour modéliser ce critère, les auteurs ont mesuré la persistance des NP effectués par les animaux pour obtenir la drogue lorsque l'injection de drogue est associée à un choc électrique dans les pattes.

Il est intéressant de noter que certains rats présentent simultanément les 3 critères modélisés et sont donc considérés comme 'dépendants' à la cocaïne. Cette population d'individus représente 17% de l'ensemble des rats testés, soit un pourcentage similaire à celui observé chez l'Homme pour la cocaïne (15% des consommateurs de cocaïne diagnostiqués comme dépendants à la cocaïne) (Anthony et coll., 1994). Tout comme chez l'Homme, la transition vers la dépendance dépendrait à la fois du degré d'exposition à la drogue et de la vulnérabilité individuelle à la drogue. Les mécanismes neuroadaptatifs mis en place suite à l'exposition chronique à la cocaïne et sous-tendant l'installation de la dépendance pourraient donc être similaires entre l'Homme et le Rat.

IV. Systèmes de neurotransmission impliqués dans les effets psychotropes de la cocaïne

Comme toute drogue, la cocaïne exerce ses effets psychotropes en perturbant le fonctionnement du système nerveux central. Les études princeps d'Olds et Milner en 1954 ont permis de mettre en évidence, à partir d'auto-stimulations électriques dans le cerveau de rats, les circuits cérébraux sous-tendant la récompense et le renforcement positif. Depuis cette

découverte, l'implication de ces circuits dans les effets renforçants des drogues a été largement établie. En effet, l'activation de ces circuits est notamment à l'origine du '*rush*' recherché par le consommateur (Killiam et coll., 1957). Ces circuits regroupent un ensemble de voies neuronales mises en jeu dans la perception de la valeur appétitive des renforcements positifs, l'intégration de stimuli environnementaux prédictifs d'une récompense et leur traduction en une réponse motrice adaptée à la recherche de ladite récompense. L'ensemble des drogues active ces circuits, mais les systèmes de neurotransmission mis en jeu dépendent de la drogue consommée. En ce qui concerne la cocaïne, celle-ci interagit directement avec les systèmes monoaminergiques DA, sérotonine (5-HT) et NA.

A. Système dopaminergique

Dans le système nerveux central, la DA est impliquée dans le contrôle de multiples fonctions, dont l'activité locomotrice (Rothwell, 2011), les processus motivationnels (Bromberg-Martin et coll., 2010), le comportement alimentaire (Volkow et coll., 2011), les fonctions sexuelles (Hull, 2011) et cognitives (Gonzalez-Burgos et Feria-Velasco, 2008 ; Foerde et Shohamy, 2011 ; Noudoost et Moore, 2011), mais également la thermorégulation (Docherty et Green, 2010), les régulations endocrines (Garcia-Tornadu et coll., 2010) et l'homéostasie cardio-vasculaire (Pyner, 2009).

1. Présentation générale

1.1. Voies dopaminergiques

On dénombre 9 noyaux dopaminergiques, notés A8 à A16, appartenant à des systèmes neuroanatomiques distincts (Anden et coll., 1965). Il existe des systèmes de projection 'très courte' comme ceux présents dans la rétine et le bulbe olfactif, des systèmes de projection 'courte' comme la voie tubéro-infundibulaire et la voie périventriculaire, et enfin des systèmes de projection 'longue'. Il s'agit de la voie nigro-striée et de la voie méso-cortico-limbique (Haber et Fudge, 1997).

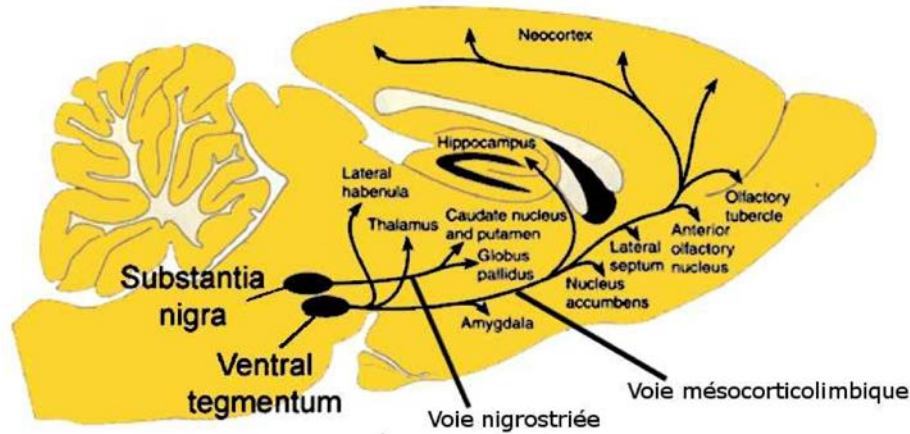


Figure 6 : Voies dopaminergiques dans l'encéphale de Rat

Les neurones de la voie nigro-striée ont leurs corps cellulaires dans la partie compacte de la substance noire (SNc, aire A9) et leurs dendrites s'étendent dans la partie réticulée de la substance noire (SNr, aire A9). Ces neurones projettent vers le CPU et vers la partie core du NAc (NAcC). Cette voie est particulièrement impliquée dans l'initiation et le contrôle de la motricité extra-pyramidale, et sa dégénérescence est associée à la maladie de Parkinson (Greer et Williams, 1963).

Les neurones de la voie méso-cortico-limbique ont leurs corps cellulaires dans l'aire tegmentale ventrale (VTA, aire A10). Ils projettent d'une part vers la partie shell du NAc (NAcS), l'amygdale et le complexe septo-hippocampique (voie méso-limbique), et d'autre part, vers le CxPF au niveau du cortex cingulaire antérieur, mais également vers les cortex piriforme et entorhinal (voie méso-corticale). La voie méso-cortico-limbique est principalement impliquée dans les processus physiologiques de récompense liés aux comportements alimentaires et sexuels, et notamment dans les processus motivationnels. Elle joue également un rôle dans le contrôle des émotions et des fonctions cognitives (Nieoullon, 2002).

Le striatum fait partie des ganglions de la base. Il est impliqué à la fois dans le contrôle de la motricité et dans le contrôle de la régulation des émotions et des fonctions cognitives. Il peut être divisé en trois parties anatomiquement distinctes : le CPU, le NAc et le globus pallidus. Le CPU peut être fonctionnellement subdivisé en deux régions. La région

dorso-latérale du striatum reçoit des afférences dopaminergiques de la SNc et constitue ainsi le striatum sensori-moteur, alors que la région ventro-médiane est majoritairement innervée par la VTA et est considérée comme étant le néostriatum. Dans le NAc, on distingue aussi une partie Core (NAcC), plus motrice, principalement innervée par la SNc, et une partie Shell (NAcS), plus limbique, recevant des afférences de la VTA. Le NAc forme donc une interface entre les systèmes limbique et moteur (Jones et Mogenson, 1980). Il reçoit également des afférences glutamatergiques du CxPF, de l'hippocampe et de l'amygdale (Nauta et coll., 1978).

Le CxPF appartient au système limbique et joue notamment un rôle dans les fonctions cognitives et émotionnelles. Il est constitué des cortex cingulaire (CxPg), prélimbique et infralimbique, ces trois structures étant toutes innervées par des afférences catécholaminergiques. Nous nous sommes intéressés au CxPg, celui-ci recevant notamment des projections dopaminergiques en provenance de la VTA.

1.2. Métabolisme de la dopamine

La synthèse de DA se déroule au niveau des terminaisons nerveuses catécholaminergiques. L'acide aminé L-Tyrosine est successivement converti en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la synthèse de DA, puis en DA suite à l'action de la L-DOPA décarboxylase.

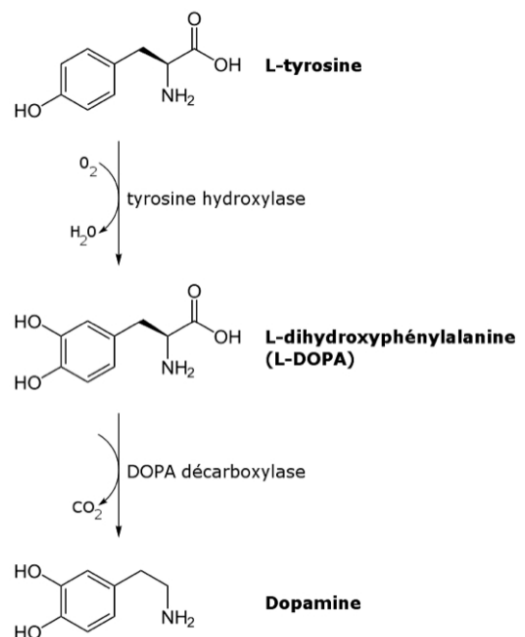


Figure 7 : **Biosynthèse de la dopamine**

La L-tyrosine est convertie en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase. La L-DOPA est ensuite transformée en DA par la DOPA décarboxylase.

Après avoir été synthétisée dans le cytosol, la DA est stockée dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons axonales, à l'aide des transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT2). La DA est ensuite libérée par exocytose, celle-ci étant déclenchée par l'arrivée de potentiels d'action. La quantité de DA libérée est donc fonction de l'activité électrique du neurone. Une fois dans la fente synaptique, la DA stimule différents récepteurs pré- et post-synaptiques, déclenchant alors l'activation de cascades intracellulaires. Elle est ensuite recaptée par l'élément pré-synaptique *via* un transporteur membranaire de la DA (DAT) et est alors, soit dégradée en acide homovanillique suite à l'action combinée des enzymes catéchol-O-méthyl-transférases (COMT) et monoamine oxydases (MAO), soit restockée dans les vésicules à l'aide des transporteurs VMAT2.

1.3. Transporteurs de la dopamine

Deux transporteurs VMAT ont été caractérisés, VMAT1 et VMAT2, constitués de douze segments transmembranaires. Le transport de la DA du cytoplasme vers l'intérieur de la vésicule synaptique est couplé à une sortie de protons (Liu et Edwards, 1997). Ces transporteurs ne sont cependant pas spécifiques de la DA, car ils permettent le stockage de l'ensemble des monoamines.

Le transporteur DAT appartient à la famille des transporteurs dépendant du sodium et du chlore (Sonders et coll., 1997). Cette protéine est constituée de 12 segments transmembranaires. La partie N-terminale jusqu'au cinquième segment transmembranaire est responsable du passage de la DA et de celui des ions sodium et chlore, alors que la partie centrale de la protéine constitue le site de fixation des antidépresseurs tricycliques. La sélectivité du DAT pour la DA est très forte (Kitayama et coll., 1992). Il permet tout de même l'entrée des neurotoxines 6-OHDA et MPTP dans les neurones dopaminergiques (Pifl et coll., 1993). Le DAT possède plusieurs sites de phosphorylation par les kinases A, C ou la '*calcium calmoduline kinase*' (Ca^{2+} /CaMK, Foster et coll., 2006) et la phosphorylation de ces sites module l'activité du DAT. Par exemple, la phosphorylation par la protéine kinase C réduit l'activité du DAT (Zhu et coll., 1997), alors que la phosphorylation par la Ca^{2+} /CaMKII augmente son activité. L'activité du DAT peut également être régulée par la DA elle-même.

1.4. Récepteurs de la dopamine et transduction du signal

Les récepteurs de la DA appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (pour revue : Beaulieu et Gainetdinov, 2011). Ils peuvent être regroupés en deux familles : la famille des récepteurs D1 et celle des récepteurs D2. Actuellement, on dénombre 5 sous-types de récepteurs dopaminergiques (notés D1 à D5) tous codés par des gènes distincts (Bunzow et coll., 1988 ; Dearry et coll., 1990 ; Sokoloff et coll., 1990 ; Sunahara et coll., 1991 ; Van Tol et coll., 1991). Un même neurone peut exprimer plusieurs sous-types de récepteurs dopaminergiques. On observe souvent une co-expression des récepteurs D1 et D3/D4 ou une co-expression des récepteurs D2 et D5.

1.4.1. Famille D1

Les récepteurs de la famille D1 sont tous codés par des gènes dont la partie codante est dépourvue d'introns. Cette famille est constituée des récepteurs D1 et D5, les récepteurs D1 étant les plus représentés dans les structures cérébrales et les plus exprimés (Fremeau et coll., 1991 ; Weiner et coll., 1991). Le récepteur D1 est fortement exprimé dans les aires de projection des neurones dopaminergiques comme le bulbe olfactif, le CPU, le NAc, la SN, l'amygdale et le cortex frontal. Il est également présent dans l'hippocampe, le cervelet, l'hypothalamus et le thalamus, mais à de plus faibles niveaux d'expression. Contrairement au récepteur D1, le récepteur D5 est peu exprimé dans le système nerveux central du Rat. Il est surtout localisé dans le CxPF, la SN, le cortex entorhinal, l'hippocampe et les noyaux thalamiques.

Les récepteurs de la famille D1 sont localisés au niveau post-synaptique et sont en général associés à une augmentation de l'activité des neurones cibles (Seamans et Yang, 2004). Ces récepteurs sont majoritairement couplés à une protéine Gs. Leur stimulation entraîne donc l'activation de l'adénylate cyclase (Kebabian et coll., 1984), ce qui induit la synthèse d'AMP cyclique (AMPC). L'augmentation des taux d'AMPC active la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle alors différentes protéines cibles dont DARPP-32 ('32-kDa dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein'), une phosphoprotéine multifonctionnelle impliquée dans l'intégration des signaux cellulaires en réponse à divers neurotransmetteurs (Svenningsson et coll., 2004). Phospho-DARPP-32 entraîne l'inhibition de la protéine phosphatase 1 (PP1) et favorise de ce fait l'état phosphorylé, notamment des récepteurs glutamatergiques, augmentant ainsi l'efficacité du signal DA. La PKA, une fois activée, peut par ailleurs se transloquer dans le noyau et y phosphoryler CREB ('cAMP responsive element

binding protein'), induisant alors l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques (voir figure 8, page 30 du manuscrit).

Certains récepteurs de la famille D1, et plus particulièrement les récepteurs D5, peuvent être couplés à une protéine Gq (Sahu et coll., 2009 ; So et coll., 2009). Leur stimulation active la phospholipase C (PLC). Ceci aboutit d'une part à l'activation de la protéine kinase C (PKC), et d'autre part, à la production d'inositol-triphosphate (IP3) (Undie et Friedman, 1990), mobilisant la concentration intracellulaire de calcium (Lin et coll., 1995) et activant alors la protéine phosphatase 2B (PP2B ou calcineurine) (voir figure 8).

1.4.2. Famille D2

Les récepteurs de la famille D2 sont codés par des gènes dont la partie codante présente des introns, donc susceptible de générer des variants par épissage alternatif. Cette famille est composée des récepteurs D2, D3 et D4. La DA présente environ 20 fois plus d'affinité pour les récepteurs D3 et D4 que pour le récepteur D2. Les récepteurs D2 sont essentiellement exprimés dans le NAc, le CPU, le CxPF, l'hypothalamus, la SN, la VTA, le septum, l'amygdale, l'hippocampe et les tubercules olfactifs (Gerfen et coll., 1990 ; Bouthenet et coll., 1991 ; Missale et coll., 1998). Les récepteurs D3 ont un profil d'expression plus limité. Ils sont majoritairement exprimés dans le NAc, les tubercules olfactifs et le cervelet (Sokoloff et coll., 1990 ; Missale et coll., 1998). Ils sont également présents dans la SN, la VTA, l'hippocampe et différentes aires corticales. Par contre, leur expression est limitée dans le CPU (Sokoloff et coll., 1990 ; Bouthenet et coll., 1991). Le récepteur D4 est quant à lui le moins exprimé dans le cerveau. Il est localisé dans le CxPF, le globus pallidus, la SN, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le thalamus (Missale et coll., 1998 ; Rondou et coll., 2010). Les récepteurs D2 et D3 semblent particulièrement importants pour la régulation de la transmission dopaminergique *via* la mise en jeu d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif. La DA peut en effet inhiber sa propre libération en se fixant sur les autorécepteurs D2 et/ou D3 présents au niveau des terminaisons dopaminergiques (Kreiss et coll., 1995 ; Gobert et coll., 1996).

Contrairement aux récepteurs de la famille D1, on trouve les récepteurs de la famille D2 aussi bien au niveau pré- que post-synaptique. Ces récepteurs sont couplés à une protéine Gi/o (Cooper et coll., 1986). Leur stimulation induit l'inhibition de l'adénylate cyclase, et par conséquent celle de la synthèse d'AMPc, empêchant l'activation de la PKA et donc la phosphorylation de DARPP-32. PP1, n'étant pas inhibée par DARPP-32, peut alors

déphosphoryler différentes cibles, dont les récepteurs glutamatergiques. Les récepteurs de la famille D2 activent également la voie issue de la PLC suite à l'activation des sous-unités G $\beta\gamma$. Ceci conduit à l'activation de la CaMKII et de la PP2B, qui déphosphoryle alors DARPP-32 et favorise de ce fait l'activation de PP1 (voir figure 8).

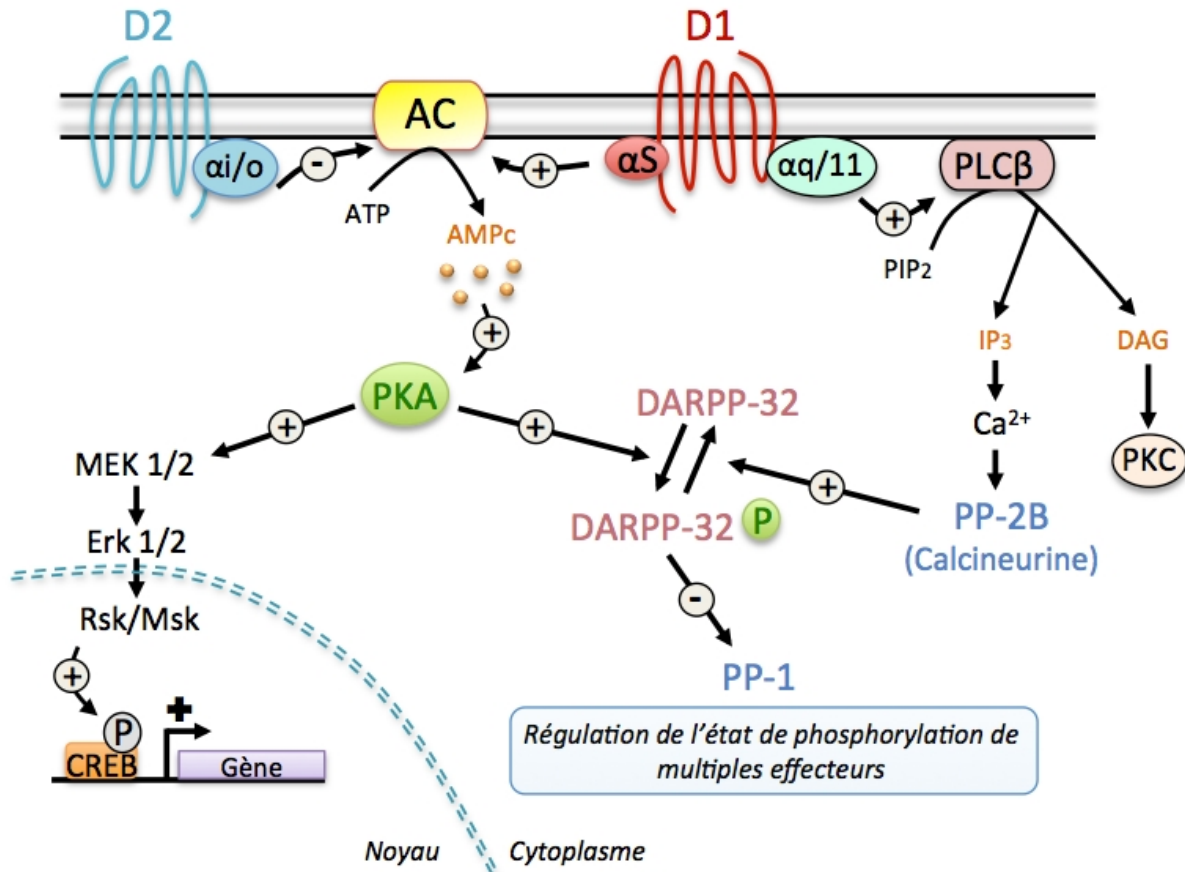


Figure 8 : Schéma bilan de l'ensemble des récepteurs dopaminergiques et des voies intracellulaires associées (adaptée de Landry et Gies, 2003)

La stimulation des récepteurs D1 de la DA active l'adénylate cyclase et la voie de la PKA, alors que la stimulation des récepteurs D2 l'inhibe. La PKA phosphoryle de nombreuses protéines cellulaires dont DARPP-32, inhibant la protéine phosphatase 1. Ceci limite la déphosphorylation des différentes protéines, amplifiant ainsi les effets du signal dopaminergique.

AC, adénylate cyclase ; *αi/o*, protéine Gi/o ; *αs*, protéine Gs ; *αq/11*, protéine Gq ; *ATP*, adénosine triphosphate ; *AMPc*, adénosine monophosphate cyclique ; *PLCβ*, phospholipase C ; *PIP2*, phosphoinositol-diphosphate ; *IP3*, inositol-triphosphate ; *DAG*, diacylglycérol ; *PKC*, protéine kinase C ; *PKA*, protéine kinase A ; *Ca²⁺*, calcium ; *PP2B*, protéine phosphatase 2B ; *PP1*, protéine phosphatase 1 ; *DARPP-32*, 32-kDa dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein ; *MEK 1/2*, mitogen-activated protein kinase kinases 1/2 ; *Erk 1/2*, extracellular signal-regulated kinases 1/2 ; *Rsk/Msk*, ribosomal s6 kinase/mitogen- and stress-activated protein kinase ; *CREB*, cAMP responsive element binding protein.

2. Effets de la cocaïne sur le système dopaminergique

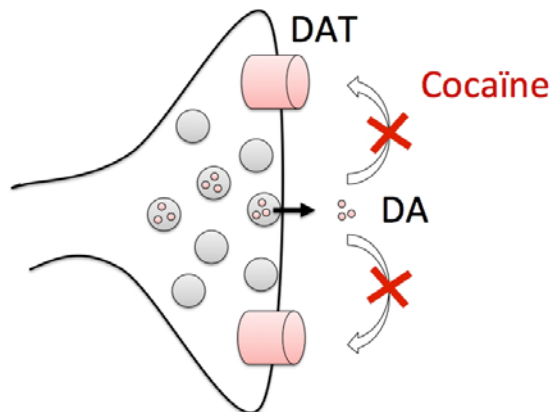
Un grand nombre d'études a démontré l'implication majeure du système dopaminergique, et plus particulièrement celle de la voie méso-cortico-limbique, dans les effets renforçants des drogues (pour revue : Chen, 1993). Le rôle de la DA a notamment été mis en évidence par des expériences de lésion du système dopaminergique. En effet, la déafférentation du NAc de même que la lésion de la VTA suite à l'injection de la neurotoxine 6-OHDA entraînent toutes deux une extinction progressive du comportement d'AA chez le Rat (Roberts et coll., 1980 ; Roberts et Koob, 1982). Il est intéressant de noter que la déafférentation du CxPF n'a, elle, aucun effet sur le maintien du comportement d'AA (Martin-Iverson et coll., 1986), mais qu'elle en perturbe par contre la mise en place (Goeders et Smith, 1986).

2.1. Action de la cocaïne sur le transporteur DAT de la dopamine

Le pouvoir renforçant des drogues résulte de leur action directe ou indirecte sur la neurotransmission dopaminergique méso-limbique. En ce qui concerne la cocaïne, celle-ci se fixe sur le DAT, au niveau de sa partie centrale, bloquant ainsi son activité et inhibant de ce fait la recapture de la DA libérée dans la fente synaptique (Buck et Amara, 1994 ; pour revue : Uhl et coll., 2002).

Figure 9 : Action de la cocaïne sur le transporteur DAT de la dopamine

La cocaïne se fixe sur le DAT, au niveau de sa partie centrale, ce qui bloque l'activité du DAT. La recapture de la DA est inhibée, provoquant une accumulation de DA dans la fente synaptique.



Plusieurs études réalisées avec des inhibiteurs du DAT, comme le GBR 12909 par exemple, ont permis de montrer le rôle du DAT dans les aspects renforçants (pour revue : Rothman et Glowa, 1995). En effet, ces composés sont capables d'induire une préférence de place et/ou un comportement d'AA chez le rongeur, ainsi que chez certains primates comme le singe écureuil (Le Pen et coll., 1996 ; Bergman et coll., 1989 ; Howell et Byrd, 1991 ; Roberts, 1993). Le lien entre effets renforçants et occupation du DAT par la cocaïne a

également pu être mis en évidence, chez l'Homme, par des expériences de tomographie par émission de positons, puisqu'on constate une importante corrélation entre le nombre de sites DAT occupés par la cocaïne et le '*rush*' ressenti par le consommateur (Volkow et coll., 1997). Le DAT est par ailleurs impliqué dans les aspects locomoteurs. En effet, chez les souris présentant une diminution de l'expression du DAT ou une invalidation du gène codant le DAT, on observe par exemple une hyperactivité exacerbée par rapport aux souris sauvages lorsqu'elles sont placées dans un nouvel environnement, hyperactivité excessive qui se maintient même après plusieurs heures d'habituation (Giros et coll., 1996 ; Sora et coll., 1998 ; Zhuang et coll., 2001). Par contre, les souris invalidées pour le DAT ne présentent plus d'hyperlocomotion induite par la cocaïne, contrairement aux souris sauvages, ce qui indique clairement que le DAT est nécessaire à l'hyperactivité induite par la cocaïne (Giros et coll., 1996 ; Sora et coll., 1998 ; Sora et coll., 2001).

Le blocage du DAT par la cocaïne, en empêchant la recapture de la DA, provoque une accumulation de DA dans la fente synaptique. Cette augmentation de la quantité de DA extracellulaire a pu être mesurée, grâce à des expériences de microdialyse *in vivo*, dans différentes structures de la voie méso-cortico-limbique, comme le CPu (Church et coll., 1987), le NAc (Di Chiara et Imperato, 1988) ou encore le CxPF (Maisonneuve et coll., 1990). L'augmentation de DA extracellulaire induite par la cocaïne semble être corrélée à une augmentation de la synthèse de DA. On note en effet une augmentation de l'activité enzymatique de la TH lors d'injections répétées de cocaïne (Masserano et coll., 1996). Un mécanisme de régulation compensatoire semble néanmoins exister afin de limiter les effets de la cocaïne lors d'une administration chronique, *via* notamment une augmentation de l'expression des transporteurs DAT à la surface membranaire des neurones dopaminergiques (Parsons et coll., 1991).

2.2. Action de la cocaïne sur les récepteurs dopaminergiques

De nombreuses études ont par ailleurs montré l'implication des récepteurs dopaminergiques dans les propriétés renforçantes de la cocaïne (pour revue : Platt et coll., 2002).

Concernant les récepteurs de la famille D1, les agonistes diminuent l'AA de différentes doses de cocaïne, ce qui indique que les agonistes D1 réduisent les effets renforçants de la cocaïne (Caine et coll., 1999 ; Platt et coll., 2001). Certaines études ont par ailleurs montré que les agonistes D1 peuvent également perturber l'initiation du

comportement d'AA de cocaïne (Caine et coll., 1999 ; Self et coll., 2000) et qu'ils diminuent la capacité de la cocaïne à réinstaller le comportement de recherche de cocaïne (Self et coll., 1996 ; Khroyan et coll., 2000). Les effets sont par contre plus complexes et contrastés lors de l'utilisation d'antagonistes D1.

Les agonistes D2 réduisent le comportement d'AA de cocaïne à la fois chez le rongeur et le primate, mais cette diminution semble plutôt refléter une potentialisation des effets renforçants de la cocaïne (Kleven et Woolverton, 1990 ; Caine et coll., 1999 et 2000). Certaines études ont par ailleurs montré que les agonistes D2 étaient capables d'induire une réinstallation du comportement de recherche de cocaïne (De Vries et coll., 1999 ; Khroyan et coll., 2000). Les antagonistes D2 perturbent également le comportement d'AA de cocaïne, modulant les propriétés renforçantes de la cocaïne (Woolverton, 1986 ; Bergman et coll., 1990 ; Britton et coll., 1991). En effet, certains antagonistes D2 permettent de diminuer durablement le comportement d'AA de cocaïne (Richardson et coll., 1994). Cependant, il est important de préciser que les doses d'antagonistes D2 efficaces pour diminuer, voire supprimer le comportement d'AA de cocaïne réduisent également l'AA de renforçateurs naturels (Woolverton et Virus, 1989).

Comme nous venons de le voir, le système dopaminergique est impliqué dans les effets renforçants de la cocaïne. Cependant, les souris invalidées pour le DAT présentent malgré tout une préférence de place pour la cocaïne, tout comme un comportement d'AA (Sora et coll., 1998 ; Rocha et coll., 1998). Ces résultats indiquent donc que d'autres systèmes de neurotransmission participent aux propriétés renforçantes de la cocaïne.

B. Système sérotoninergique

Les effets de la 5-HT au niveau du système nerveux central sont nombreux et complexes. La 5-HT intervient notamment dans la régulation des cycles veille-sommeil (Monti, 2011), de l'humeur (Ruhé et coll., 2007), des fonctions cognitives (King et coll., 2008 ; Codony et coll., 2011), des comportements alimentaires (Halford et coll., 2005 ; Halford et Harrold, 2012) et sexuels (Hull, 2011), ou encore de la température (Fox et coll., 2007 ; Docherty et Green, 2010).

1. Présentation générale

1.1. Voies sérotoninergiques

Les neurones sérotoninergiques sont localisés dans les noyaux mésencéphaliques et bulbaires du raphé, noyaux numérotés B1 à B9 selon l'axe rostro-caudal (Anden et coll., 1965). Ces neurones projettent d'une part dans la moelle épinière *via* un système de projection descendant issu des noyaux B1 à B4, et d'autre part dans le cerveau *via* un système de projection ascendant constitué de deux faisceaux principaux, le faisceau dorsal et le faisceau ventral (Jacobs et Azmitia, 1992).

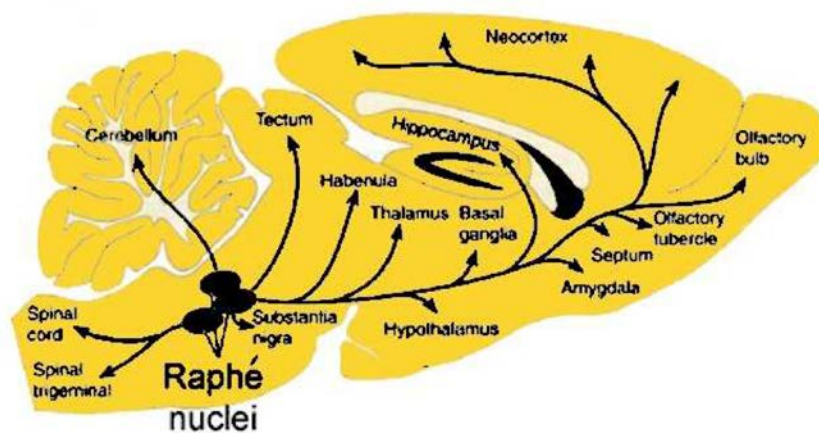


Figure 10 : Voies sérotoninergiques dans l'encéphale de Rat

Le faisceau dorsal est issu du noyau dorsal du raphé. Il innerve le néocortex au niveau du cortex frontal, du cortex pariétal et du cortex occipital, le CPU, le NAc, la SN, la VTA, l'amygdale, l'hippocampe ventral et le cervelet.

Le faisceau ventral est quant à lui issu du noyau médian du raphé. Il innerve le NAc, l'amygdale, l'hippocampe dorsal, le septum et le thalamus.

1.2. Métabolisme de la sérotonine

La 5-HT est synthétisée en deux étapes à partir du L-tryptophane. Celui-ci est tout d'abord hydroxylé en L-5-hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT. Le L-5-hydroxytryptophane est ensuite décarboxylé en 5-HT

par la ‘décarboxylase des acides aminés aromatiques’, la même enzyme qui assure la décarboxylation de la L-DOPA.

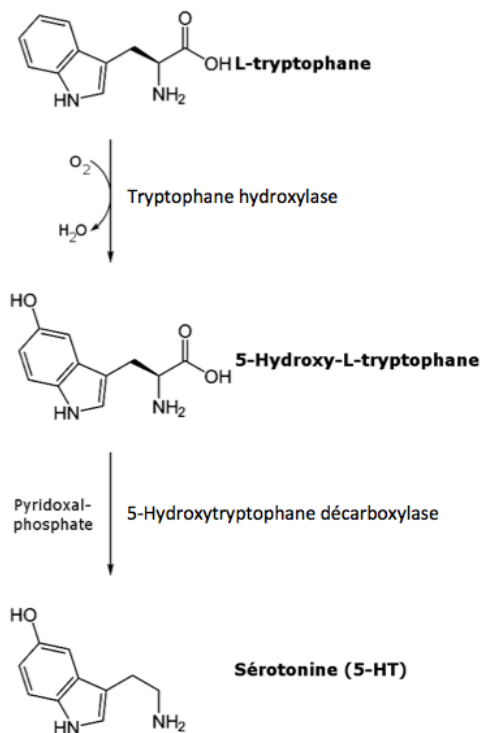


Figure 11 : **Biosynthèse de la sérotonine**

Le L-tryptophane est converti en 5-hydroxy-L-tryptophane par la tryptophane hydroxylase. Le 5-hydroxy-L-tryptophane est ensuite transformé en 5-HT par la 5-hydroxytryptophane décarboxylase ou ‘décarboxylase des acides aminés aromatiques’.

Après avoir été synthétisée dans le cytoplasme, la 5-HT est stockée dans les vésicules *via* les transporteurs vésiculaires VMAT1 et VMAT2 communs aux diverses monoamines. Une fois libérée dans la fente synaptique, la 5-HT stimule différents récepteurs sérotoninergiques, déclenchant l’activation de voies de signalisation intracellulaires. La majeure partie de la 5-HT est ensuite recapturée par le neurone pré-synaptique, par l’intermédiaire du transporteur membranaire de la 5-HT (SERT). Tout comme le DAT, ce transporteur appartient à la famille des transporteurs dépendant du sodium et du chlore (Sonders et coll., 1997) et est constitué de 12 segments transmembranaires. La dégradation de la 5-HT est assurée par la MAO, qui convertit la 5-HT en 5-hydroxyindole acétaldéhyde. Cet aldéhyde est ensuite oxydé par une aldéhyde déshydrogénase en acide 5-hydroxyindol-acétique, métabolite prédominant de la 5-HT.

1.3. Récepteurs de la sérotonine et transduction du signal

Les récepteurs sérotoninergiques sont nombreux. Au moins 14 gènes codent ces récepteurs et des mécanismes d’épissage alternatif permettent, *in fine*, de générer au moins 30

récepteurs distincts (pour revue : Raymond et coll., 2001). Par convention, ces récepteurs sont répartis en 7 familles, notées 5-HT1 à 5-HT7, en fonction des analogies de structures des gènes (Hoyer et coll., 1994 et 2002). A l'exception des récepteurs-canaux 5-HT3, les 6 autres familles comportent des récepteurs couplés à des protéines G. Ces récepteurs peuvent être localisés au niveau somato-dendritique, pré-synaptique ou post-synaptique. La figure 12 décrit brièvement les signalisations de ces divers types de récepteurs sérotoninergiques.

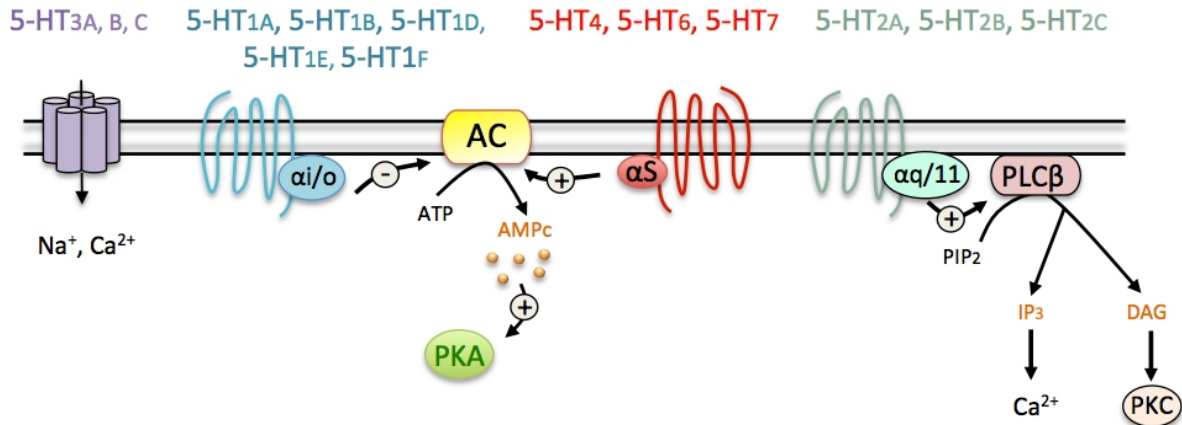


Figure 12 : Schéma bilan de l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques et des voies intracellulaires associées (adaptée de Landry et Gies, 2003)

Les récepteurs 5-HT3 sont couplés à un canal cationique permettant l'entrée de sodium et de calcium. Les récepteurs 5-HT1 sont couplés à la protéine Gi/o, inhibant l'adénylate cyclase. Les récepteurs 5-HT4, 6 et 7 sont couplés à une protéine Gs, stimulant l'adénylate cyclase et donc la formation d'AMP cyclique. Les récepteurs 5-HT2 sont couplés à une protéine Gq, activant la phospholipase C.

AC, adénylate cyclase ; *Gi/o*, protéine Gi/o ; *Gs*, protéine Gs ; *Gq/11*, protéine Gq ; ATP, adénosine triphosphate ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; PLCβ, phospholipase C ; PIP2, phosphoinositol-diphosphate ; IP3, inositol-triphosphate ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C, PKA, protéine kinase A ; Ca²⁺, calcium ; Na⁺, sodium.

2. Effets de la cocaïne sur le système sérotoninergique

En plus du DAT, la cocaïne se fixe sur le SERT, bloquant ainsi son activité et inhibant de ce fait la recapture de la 5-HT, qui s'accumule alors dans la fente synaptique. La cocaïne fixe d'ailleurs le SERT avec 5 fois plus d'affinité que le DAT (White et Kalivas, 1998).

Bien qu'il soit établi que le système dopaminergique intervient majoritairement dans les effets de la cocaïne et notamment dans les propriétés renforçantes de la drogue, nous avons vu précédemment que les souris invalidées pour le DAT présentent malgré tout une préférence pour la cocaïne, ainsi qu'un comportement d'AA (Sora et coll., 1998 ; Rocha et

coll., 1998). Lorsque le gène codant le SERT est invalidé, on observe toujours une préférence de place pour la cocaïne (Sora et coll., 1998). Par contre, celle-ci disparaît chez les souris doublement mutées pour le DAT et le SERT (Sora et coll., 2001), ce qui démontre l'implication de ces deux systèmes de neurotransmission dans les propriétés renforçantes de la cocaïne.

Différentes études témoignent par ailleurs de l'implication des récepteurs sérotoninergiques dans les effets renforçants de la cocaïne. En effet, plusieurs agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT sont capables de moduler le comportement d'AA, et ce de manière différentielle en fonction du type de récepteur ciblé. Par exemple, les agonistes 5-HT_{1A} diminuent l'AA de cocaïne, alors que les agonistes 5-HT_{1B} augmentent l'AA de cocaïne (Peltier et Schenk, 1993 ; Parson et coll., 1998). On peut également citer les agonistes 5-HT_{2C} qui diminuent l'AA de cocaïne, contrairement aux antagonistes 5-HT_{2C} qui l'augmentent (Fletcher et coll., 2002 ; Grottick et coll., 2000). Enfin, on peut s'intéresser aux antagonistes 5-HT_{2A} qui eux n'empêchent pas la mise en place du comportement d'AA de cocaïne, mais inhibent par contre la réactivation de ce comportement suite à une période de sevrage (Fletcher et coll., 2002).

C. Système noradrénergique

La NA du système nerveux central intervient dans différents processus. On peut notamment citer son implication dans le cycle veille-sommeil (Nestler et coll., 1999), la vigilance, les situations d'alerte ou de stress (Foote et coll., 1983 ; Berridge et Waterhouse, 2003), les émotions et les désordres affectifs (Ressler et Nemeroff, 1999 ; Zhu et coll., 1999) ou encore l'apprentissage et la mémoire (Friedman et coll., 1999).

1. Présentation générale

1.1. Voies noradrénergiques

Au niveau cérébral, les noyaux noradrénergiques sont situés dans la partie latérale du bulbe et de la région pontique. On en distingue 7 groupes, dont le plus dense est le locus coeruleus (groupe A6). Ce noyau noradrénergique, situé à la jonction ponto-mésencéphalique, projette *via* la voie ascendante dorsale sur de nombreuses structures cérébrales, et notamment sur les noyaux du raphé, le thalamus, l'hypothalamus, le cortex cérébelleux, l'hippocampe et le néocortex (Moore et Bloom, 1979).

1.2. Métabolisme de la noradrénaline

La NA est synthétisée dans les neurones noradrénergiques à partir de la DA. La DA stockée dans les vésicules synaptiques est β -hydroxylée en NA par la dopamine β -hydroxylase. La NA est ensuite libérée dans la synapse où elle se lie à différents récepteurs. La NA est recaptée par l'élément présynaptique par l'intermédiaire du transporteur membranaire de la NA (NET). Elle est alors dégradée soit en 3-méthoxy-4-hydroxyphényléthylène glycol suite à l'intervention successive de la MAO, d'une réductase, puis de la COMT, soit en acide vanillymandélique *via* la MAO, une déshydrogénase, et enfin la COMT. La NA peut également être dégradée directement dans la fente synaptique en normétanéphrine par la COMT.

1.3. Récepteurs de la noradrénaline et transduction du signal

Les récepteurs noradrénergiques sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Ces récepteurs peuvent être répartis en deux catégories, les récepteurs α ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ et $\alpha 2C$) et les récepteurs β ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$) (Levitzki, 1986 ; Summers et McMartin, 1993 ; Ruffolo et Hieble, 1994).

Les récepteurs $\alpha 1$ sont majoritairement couplés à une protéine Gq. Leur stimulation active donc la voie de la PLC. Lorsqu'ils sont présynaptiques, ces autorécepteurs facilitent la libération de NA. Les récepteurs $\alpha 2$ sont couplés à une protéine Gi/o. Leur activation inhibe l'adénylate cyclase et la voie de la PKA. Au niveau présynaptique, ils permettent un rétrocontrôle négatif de la libération de NA par l'intermédiaire d'une diminution de l'influx calcique.

Les récepteurs β sont majoritairement couplés à une protéine Gs qui active l'adénylate cyclase, ce qui entraîne une augmentation de la concentration d'AMPC et une activation de la voie de signalisation de la PKA.

2. Effets de la cocaïne sur le système noradrénergique

En plus d'inhiber le DAT et le SERT, la cocaïne est capable d'inhiber le NET, ce qui induit une accumulation de NA dans la fente synaptique. Celle-ci a notamment été détectée dans le NAc et le CxPF (Florin et coll., 1994). Différentes études ont montré l'implication du système noradrénergique dans les effets de la cocaïne. Les souris transgéniques invalidées

pour la DA β -hydroxylase par exemple ne présentent plus de préférence pour la cocaïne. Il est intéressant de préciser que ces souris acquièrent cependant une préférence de place pour la nourriture (Jasmin et coll., 2006). La NA serait donc nécessaire à la perception des effets renforçants de la cocaïne. Les récepteurs $\alpha 1$, et notamment le récepteur $\alpha 1B$, semblent jouer un rôle particulièrement important dans les effets de la cocaïne car les souris invalidées pour ce récepteur présentent une diminution de l'hyperactivité locomotrice et de la sensibilisation comportementale induites par la cocaïne (Drouin et coll., 2002).

D. Système glutamatergique

Le glutamate (Glu) est largement distribué dans l'ensemble du système nerveux central, au sein duquel il est le principal neurotransmetteur excitateur. Il intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques. On peut par exemple citer son implication dans les processus de plasticité synaptique (MacDonald et coll., 2006 ; Lee et Kirkwood, 2011), et notamment dans la potentialisation à long terme, ce qui lui confère un rôle majeur dans les fonctions cognitives, et plus particulièrement dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Peng et coll., 2011). Le Glu est par ailleurs impliqué dans le développement du système nerveux central (Griesmaier et Keller, 2012), ainsi que dans les phénomènes d'excitotoxicité neuronale (Lau et Tymianski, 2010).

Au vu de la diversité des voies glutamatergiques et par conséquent des rôles du Glu dans le système nerveux central, nous nous limiterons dans cette partie aux interactions Glu-DA au sein des structures du système de récompense, ainsi qu'à une présentation brève des principaux récepteurs glutamatergiques utiles pour la compréhension du manuscrit.

1. Présentation des récepteurs AMPA et NMDA

Les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont des récepteurs canaux à perméabilité cationique, constitués de l'association de différentes sous-unités sous une forme tétra- ou pentamérique (Landry et Gies, 2003).

Les récepteurs AMPA sont des homomères ou des hétéromères constitués de l'association des sous-unités GluR1 à GluR4. Ces récepteurs sont perméables aux ions Na^+ et K^+ . Certains d'entre eux présentent également une perméabilité aux ions Ca^{2+} , en fonction de la substitution ou non d'un résidu glutamine par un résidu arginine au niveau du segment

suivant la première hélice de la sous-unité GluR2. Les récepteurs AMPA sont principalement post-synaptiques. Ils sont largement distribués dans tout le système nerveux central, et plus particulièrement dans le cortex, la partie ventrale du striatum, l'hippocampe ou encore l'amygdale (pour revue : Meador-Woodruff et Healy, 2000).

Les récepteurs NMDA sont constitués des sous-unités NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D et NR3A, assemblées sous forme hétéropentamérique ou hétérotétramérique. Leurs propriétés varient en fonction des sous-unités présentes, mais il semble cependant que la sous-unité NR1 soit essentielle au fonctionnement du récepteur. Les récepteurs NMDA sont tous perméables aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , cette perméabilité au calcium étant à l'origine de leur implication majeure dans les phénomènes d'excitotoxicité neuronale d'une part, et de potentialisation à long terme d'autre part (Bliss et Collingridge, 1993). Les récepteurs NMDA sont essentiellement post-synaptiques. Ils sont très largement distribués dans l'ensemble du système nerveux central et sont généralement colocalisés avec les récepteurs AMPA. Ils sont plus particulièrement exprimés dans le cerveau antérieur, et notamment dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Ozawa et coll., 1998). Différents régulateurs peuvent modifier le fonctionnement des récepteurs NMDA. Il existe en effet de nombreux modulateurs allostériques capables de potentialiser ou au contraire de diminuer l'activation des récepteurs NMDA. La glycine est un co-agoniste indispensable à l'activation du récepteur NMDA (Vyklícky et coll., 1990), tandis que les ions Mg^{2+} exercent un blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA (Ascher et Nowak, 1988). Ainsi, au potentiel de repos, la majorité des récepteurs NMDA est bloquée par un 'bouchon' Mg^{2+} . La levée de ce blocage, et par conséquent l'activation des récepteurs NMDA, est donc dépendante d'une dépolarisation membranaire, induite notamment par l'activation des récepteurs AMPA colocalisés avec les récepteurs NMDA.

2. Interactions dopamine/glutamate dans le système de récompense

Ces interactions DA/Glu peuvent s'observer aussi bien au niveau du CxPF que du striatum (voir figure 13, page 45 du manuscrit).

Dans le CxPF, le récepteur D1 est environ 20 fois plus abondant que le récepteur D2 (Goldman-Rakic et coll., 1990). La DA, en activant les récepteurs D1, induit alors une augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux du CxPF (Henze et coll., 2000), et ce en favorisant un courant Na^+ et en inhibant un courant K^+ (Gorelova et Yang, 2000). Les effets diffèrent cependant en fonction des concentrations de DA. Les réponses NMDA sont

potentialisées par de faibles concentrations de DA suite à l'activation des récepteurs D1, tandis qu'elles sont, au contraire, diminuées par de fortes concentrations de DA suite à la mise en jeu des récepteurs D2. Ces interactions DA/Glu au sein du CxPF sont impliquées dans les processus de plasticité synaptique. Les agonistes D1, par exemple, exercent une action excitatrice sur les neurones pyramidaux du CxPF, qui semble être essentielle à l'induction de la potentialisation à long terme au niveau de la voie hippocampo-corticale (Laroche et coll., 2000). La DA facilite par ailleurs la mise en place de phénomènes de dépression à long terme des afférences glutamatergiques de la couche III du CxPF, suite à l'activation des récepteurs D2 (Otani et coll., 1998 et 1999).

Le striatum est majoritairement composé de neurones épineux de taille moyenne (*'medium spiny neurons'*) GABAergiques. L'activité de ces neurones est régulée, notamment au niveau du NAc, par des afférences glutamatergiques en provenance de l'hippocampe, de l'amygdale et du CxPF (Mulder et coll., 1998). Par exemple, la stimulation des projections glutamatergiques de l'hippocampe active les neurones de la VTA, induisant une augmentation de la DA dans le NAc, *via* l'activation des récepteurs D1, et conduisant *in fine* à la potentialisation de l'activité des neurones épineux GABAergiques (Floresco et Phillips, 2001). Des résultats similaires sont obtenus suite à la stimulation de la voie glutamatergique en provenance de l'amygdale et innervant le NAc (Floresco et Phillips, 2001). Les afférences glutamatergiques sont elles-mêmes modulées par la transmission dopaminergique. L'activation des récepteurs D2 pré-synaptiques induit en effet une diminution de la libération de DA, ce qui conduit à une baisse de la transmission glutamatergique dans les neurones épineux de taille moyenne (Harvey et Lacey, 1996). Au contraire, la stimulation des récepteurs D1 post-synaptiques favorise la réponse au Glu dans les neurones épineux de taille moyenne (Chergui et Lacey, 1999). Le Glu et la DA exercent donc un contrôle réciproque sur leur libération respective au sein des ganglions de la base (Mogenson et coll., 1988) et la DA jouerait un rôle 'permissif' en modulant le taux signal/bruit dans le NAc (DeFrance et coll., 1985).

3. Effets de la cocaïne sur le système glutamatergique

L'administration répétée de cocaïne induit une augmentation des concentrations extracellulaires de Glu dans la VTA, le NAc, la SNc et l'hippocampe (Kalivas et Duffy, 1995 ; Smith et coll., 1995), ainsi qu'une modulation de l'expression des différents sous-types de récepteurs glutamatergiques (Churchill et coll., 1999 ; Ghasemzadeh et coll., 1999).

L'implication du système glutamatergique dans les effets de la cocaïne a par ailleurs pu être démontrée grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques. Ainsi, les agonistes des récepteurs NMDA augmentent les propriétés renforçantes de la cocaïne et facilitent la rechute après une période de sevrage (Cornish et coll., 1999). Les récepteurs NMDA ne sont cependant pas les seuls à intervenir dans les phénomènes de rechute puisque les récepteurs AMPA semblent également impliqués (Cornish et Kalivas, 2000). Au contraire, les antagonistes NMDA bloquent l'acquisition du comportement d'AA de cocaïne (Schenk et coll., 1993). Les antagonistes des récepteurs NMDA et AMPA empêchent également l'établissement de la sensibilisation comportementale, et ce en régulant l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Kalivas et coll., 1993 ; Wolf, 1998). Nous avons par ailleurs montré que les antagonistes NMDA bloquent l'induction du gène précoce *Egr-1* par la cocaïne (Jouvert et coll., 2002). Ainsi, le système glutamatergique module les effets de la cocaïne, les interactions DA/Glu décrites précédemment apparaissant essentielles au mode d'action de la cocaïne.

E. Système GABAergique

Le GABA (acide γ -aminobutyrique) est exclusivement présent dans le système nerveux central, dont il est le principal neurotransmetteur inhibiteur. Il y est largement distribué puisqu'on estime qu'il serait impliqué dans au moins 30% des synapses du cerveau. Le GABA joue par conséquent de nombreux rôles au sein de l'encéphale. Il est en effet impliqué dans le maintien de l'ensemble des fonctions cérébrales, en contrebalançant notamment les effets excitateurs du Glu. Le GABA intervient par exemple dans les processus de développement cérébral (Ikonomidou et coll., 2001), dans l'anxiété (Lydiard, 2003), la régulation des cycles veille-sommeil (Gvilia, 2010) ou encore la mémoire (Makkar et coll., 2010).

Au vu de la diversité des voies GABAergiques et par conséquent des rôles du GABA dans le système nerveux central, nous nous limiterons dans cette partie aux interactions GABA-DA au sein des structures du système de récompense, ainsi qu'à une présentation brève des récepteurs GABAergiques.

1. Présentation des récepteurs GABAergiques

Le GABA exerce ses effets par l'intermédiaire de deux types de récepteurs : des récepteurs ionotropes et des récepteurs métabotropes (Macdonald et Olsen, 1994 ; Misgeld et coll., 1995 ; pour revues : Barnard et coll., 1998 ; Landry et Gies, 2003).

Les récepteurs ionotropes du GABA ou récepteurs GABA-A sont des récepteurs-canaux à perméabilité anionique. Leur stimulation induit une entrée de chlore, ce qui provoque une hyperpolarisation de l'élément post-synaptique. Les récepteurs GABA-A ont une structure hétéropentamérique. Ces récepteurs sont pharmacologiquement caractérisés par leur affinité pour des agonistes/antagonistes compétitifs des sites de fixation du GABA, dont on peut notamment citer le muscimol (agoniste compétitif) et la bicuculline (antagoniste compétitif). Il existe plusieurs types de sous-unités (α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ , θ), chacune pouvant présenter plusieurs isoformes ($\alpha 1$ à 6, $\beta 1$ à 4, $\gamma 1$ à 3, $\rho 1$ à 3), ainsi que des variants obtenus par épissage alternatif. Le nombre de récepteurs GABA-A potentiels est donc extrêmement élevé.

Les récepteurs métabotropes du GABA ou GABA-B sont des récepteurs heptahélicoïdaux couplés à une protéine Gi/o. Leur stimulation induit donc une inhibition de l'adénylate cyclase et des voies de signalisation associées. On distingue deux types de récepteurs GABA-B codés par deux gènes distincts, GABA-B1 et GABA-B2, ces récepteurs étant tous deux spécifiquement stimulés par le baclofène et insensibles à la bicuculline. Ces récepteurs peuvent être pré- ou post-synaptiques. Lorsqu'ils sont pré-synaptiques, ils jouent le rôle d'autorécepteurs ou d'hétérorécepteurs et diminuent ainsi la libération de neuromédiateurs. Lorsqu'ils sont post-synaptiques, leur stimulation induit alors une augmentation de la conductance potassique, conduisant à l'hyperpolarisation de l'élément post-synaptique.

2. Interactions dopamine/GABA dans le système de récompense

Ces interactions s'observent au niveau du striatum, ainsi que du mésencéphale (voir figure 13, page 45 du manuscrit).

Les neurones du striatum co-expriment avec le GABA certains peptides comme la substance P (Kanazawa et coll., 1977), l'enképhaline (Sar et coll., 1978) ou encore la dynorphine (Vincent et coll., 1982). Les neurones GABAergiques synthétisant la substance P expriment majoritairement les récepteurs D1 de la DA, alors que les récepteurs D2 sont

essentiellement localisés sur les neurones co-exprimant l'enképhaline (Gerfen et coll., 1990 ; Le Moine et coll., 1991). En plus des récepteurs dopaminergiques, les neurones épineux de taille moyenne expriment également des récepteurs GABA-A et GABA-B (Yung et coll., 1999 ; Schwarzer et coll., 2001). Ces neurones constituent la voie de sortie du striatum et projettent sur la SN, le globus pallidus interne et externe. Outre les neurones épineux de taille moyenne, le striatum comporte également 10% d'interneurones : cholinergiques, NOergiques ou GABAergiques (Bolam et coll., 1983 ; Oertel et Mugnaini, 1984). Ces derniers expriment les récepteurs D1 de la DA (Bracci et coll., 2002) ainsi que certaines sous-unités des récepteurs GABA-A (Schwarzer et coll., 2001).

Au niveau des structures dopaminergiques du mésencéphale, on trouve des neurones de projection GABAergiques dans la SNr. Ceux-ci expriment des auto-récepteurs GABA-A et GABA-B. La partie caudale de la VTA (queue de la VTA ou tVTA) contient également des neurones GABAergiques, projetant sur les neurones dopaminergiques mésolimbiques et régulant par conséquent leur activité (Kaufling et coll., 2010).

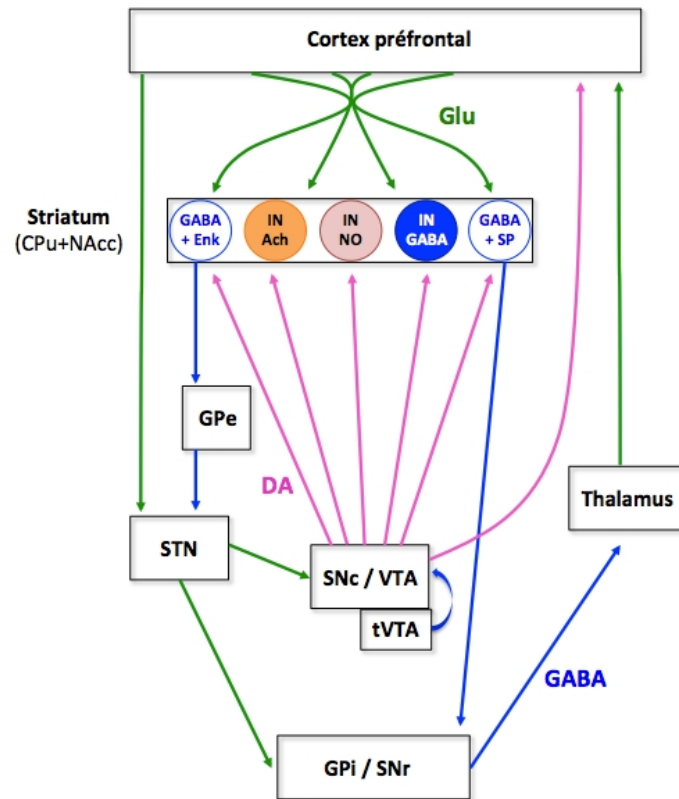


Figure 13 : Schéma bilan des interactions dopamine/glutamate/GABA dans le système des ganglions de la base (adaptée de Svenningsson et coll., 2004)

En vert, les projections glutamatergiques (Glu). En rose foncé, les projections dopaminergiques (DA). En bleu, les projections GABAergiques. En orange, l'acétylcholine (Ach). En rose pâle, le monoxyde d'azote (NO).

CPu, caudé putamen ; NAc, noyau accumbens ; GPe/i, globus pallidus externe/interne ; STN, noyau sous-thalamique ; SNc/r, substance noire compacte/réticulée ; VTA, aire tegmentale ventrale ; tVTA, queue de l'aire tegmentale ventrale ; Enk, enképhaline ; SP, substance P ; IN Ach, interneurons cholinergiques ; IN NO, interneurons NOergiques ; IN GABA, interneurons GABAergiques.

3. Effets de la cocaïne sur le système GABAergique

Du fait des nombreuses interactions DA-GABA décrites précédemment dans les structures du système de récompense, plusieurs études ont cherché à étudier le rôle du GABA dans les mécanismes d'action de la cocaïne. Celles-ci ont notamment permis de montrer qu'un traitement chronique par la cocaïne induisait une diminution des taux de GABA dans le CPU (Jung et coll., 1999), ainsi qu'une modulation de l'expression des différents récepteurs de type GABA-A et GABA-B (Yamaguchi et coll., 2000 ; Li et coll., 2003). Au contraire, la stimulation du système GABAergique est associée à une diminution des concentrations de DA dans le CPU et le NAc. Le GABA aurait donc un effet répresser sur l'hyperdopaminergie induite par la cocaïne (Gruen et coll., 1992). Différentes études ont par ailleurs montré que

l'utilisation de benzodiazépines (Goeders et coll., 1989) ou de baclofène (Roberts et Andrews, 1997) entraîne une diminution globale de l'AA de cocaïne.

Ainsi, par son rôle de modulateur de la neurotransmission dopaminergique, le système GABAergique modifie les propriétés renforçantes de la cocaïne et induit une diminution de l'efficacité de la cocaïne.

V. Plasticité induite par la cocaïne

La dépendance aux drogues est associée à des changements à long terme dans le comportement des individus, dont le '*craving*' et la rechute. Au niveau cérébral, la prise chronique de drogue est corrélée à des phénomènes de plasticité structurale et synaptique dans les principales structures du système de récompense. Ces phénomènes étant persistants, ils sont candidats pour sous-tendre les changements comportementaux observés dans la dépendance.

A. Plasticité structurale induite par la cocaïne

La prise chronique de drogue est associée à deux principaux types de plasticité structurale : des changements dans la taille des corps cellulaires (Skclair-Tavron et coll., 1996) et des modifications de l'arborisation dendritique, de la morphologie et du nombre d'épines (Robinson et Kolb, 1997 ; pour revue : Russo et coll., 2010).

Les psychostimulants comme la cocaïne induisent une augmentation de la complexité dendritique et de la densité d'épines dans les neurones épineux de taille moyenne du NAc, dans les neurones dopaminergiques de la VTA et dans les neurones pyramidaux du CxPF médian (Robinson et Kolb, 1997 et 1999 ; Robinson et coll., 2001 ; Norrholm et coll., 2003 ; Lee et coll., 2006 ; Sarti et coll., 2007 ; Kim et coll., 2009). Ces modifications structurales sont associées au développement d'une sensibilisation comportementale à la drogue (Robinson et Kolb, 2004 ; Russo et coll., 2009).

B. Plasticité synaptique induite par la cocaïne

Plusieurs études réalisées sur tranches de cerveau ont montré que des phénomènes de plasticité synaptique, comme la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long

terme (LTD), pouvaient être induits au niveau des synapses glutamatergiques de la VTA et du NAc (Pennartz et coll., 1993 ; Bonci et Malenka, 1999 ; Robbe et coll., 2002 ; Bellone et Lüscher, 2005 ; Schotanus et Chergui, 2008 ; pour revue : Chen et coll., 2010). Ces modulations de la ‘force’ de la synapse sont corrélées notamment au trafic et à l’expression membranaire des différentes sous-unités des récepteurs AMPA du glutamate (Lüscher et coll., 1999 ; pour revue : Kauer et Malenka, 2007). En effet, la LTD est associée à une internalisation des récepteurs AMPA, particulièrement de ceux contenant la sous-unité GluR1, alors que l’on observe au niveau des synapses potentialisées une augmentation de l’insertion de récepteurs AMPA dans la membrane cellulaire, dont ceux contenant la sous-unité GluR1, ces récepteurs permettant une facilitation des événements cellulaires dépendants du calcium (pour revue : Kauer et Malenka, 2007).

1. Plasticité synaptique dans l’aire tegmentale ventrale et cocaïne

La capacité des drogues à induire des phénomènes de plasticité synaptique dans la VTA a tout d’abord été démontrée suite à l’injection aigue de cocaïne (Ungless et coll., 2001). Celle-ci induit en effet une potentialisation des synapses glutamatergiques dans les neurones dopaminergiques de la VTA, associée à une augmentation des courants AMPA (Argilli et coll., 2008). Cette potentialisation est cependant transitoire, puisqu’elle est observée 5 jours après l’injection de cocaïne, mais pas 10 jours après (Ungless et coll., 2001). On aurait tendance à attribuer cette courte durée de la LTP dans la VTA au fait qu’une seule injection de cocaïne ait été administrée. Mais, de manière surprenante, la LTP induite par un traitement chronique à la cocaïne (7 jours, 1 injection/jour) est similaire à celle observée suite à l’injection aigue de cocaïne : comme précédemment, la LTP n’est plus observée 10 jours après la dernière injection de cocaïne (Borgland et coll., 2006).

Comme les mécanismes d’apprentissage associatifs peuvent jouer un rôle important dans le développement de la dépendance, d’autres auteurs ont cherché à étudier les changements de plasticité synaptique dans la VTA dans des modèles d’AA de cocaïne. L’AA de cocaïne, tout comme celle de renforçateurs naturels, induit des phénomènes de LTP dans la VTA, mais seule la LTP induite par l’AA de cocaïne est encore observée après 3 mois d’abstinence (Chen et al., 2008). Ces données renforcent l’hypothèse que les drogues détournent les mécanismes d’apprentissage et de mémoire normalement mis en jeu par les renforçateurs naturels. De plus, la LTP induite par l’AA de cocaïne est observée même après l’extinction du comportement de recherche de drogue. Ainsi, les neuroadaptations induites par

l'AA de cocaïne formeraient une sorte de souvenir qui resterait intact en l'absence de comportements de recherche de drogue, et qui pourrait donc être à l'origine de la rechute activée par l'exposition à des indices environnementaux liés à la drogue.

2. Plasticité synaptique dans le noyau accumbens et cocaïne

Les résultats concernant les phénomènes de plasticité induits par la cocaïne dans le NAc sont plus complexes que ceux décrits dans la VTA. Néanmoins, on sait que, contrairement à ce qui est observé dans la VTA, une injection aigue de cocaïne ne modifie pas les courants AMPA dans le NAc (pour revue : Thomas et coll., 2008). Par contre, l'administration répétée de drogue module fortement la transmission excitatrice dans le NAc. En effet, on observe une diminution des courants AMPA rapidement après la dernière injection de cocaïne, dans le NAcS mais pas dans le NAcC (Schramm-Sapyta et coll., 2006 ; Kourrich et coll., 2007). L'exposition chronique à la cocaïne favoriserait donc une dépression de la transmission synaptique excitatrice dans le NAc. D'autres études ont montré que cette LTD induite dans le NAc pourrait sous-tendre l'expression de la sensibilisation comportementale (Thomas et coll., 2001 ; Brebner et coll., 2005). Chez des animaux présentant une sensibilisation comportementale et soumis à une période de sevrage, la LTD serait suivie d'une augmentation des courants AMPA, corrélée à une augmentation de l'expression de récepteurs AMPA, notamment de la sous-unité GluR1, à la surface des cellules (Boudreau et Wolf, 2005 ; Kourrich et coll., 2007).

De manière intéressante, la transmission synaptique excitatrice dans le NAc peut être dynamiquement régulée par une exposition aigue à la cocaïne après une période d'abstinence, qui elle-même suit un traitement chronique. En effet, la réexposition à la cocaïne durant l'abstinence induit une brève augmentation du nombre de récepteurs AMPA membranaires (Anderson et coll., 2008), rapidement convertie en une diminution des courants AMPA, reflétant vraisemblablement un phénomène de LTD (Thomas et coll., 2001 ; Kourrich et coll., 2007). Cet effet est corrélé à une internalisation des récepteurs AMPA, et plus particulièrement de la sous-unité GluR1, présents à la surface de la cellule suite à la réexposition à la cocaïne (Boudreau et coll., 2007). Ces données indiquent que les synapses excitatrices du NAc sont rapidement et fortement modulées par le vécu de l'animal. Elles suggèrent par ailleurs que la diminution des courants AMPA observée juste après la dernière injection lors d'un traitement chronique par la cocaïne (Schramm-Sapyta et coll., 2006 ; Kourrich et coll., 2007) pourrait refléter le fait que l'animal vient d'être exposé à la drogue.

C. Corrélation entre plasticité structurale et plasticité synaptique

Plusieurs études portant sur le rôle des modifications des épines dendritiques ont montré que la taille et la forme des épines était corrélée aux différents processus de plasticité synaptique, comme la LTP et la LTD (Carlisle et Kennedy, 2005 ; Bourne et Harris, 2007).

Un traitement chronique par la cocaïne induit en effet une modification de la morphologie des épines dendritiques dans le NAc, corrélée à des changements de plasticité synaptique. Rapidement après la dernière exposition à la cocaïne, on observe une augmentation du nombre d'épines dites 'fines' (les épines les plus plastiques), associée à une dépression synaptique (Thomas et coll., 2001 ; Shen et coll., 2009), ce qui représenterait une augmentation du nombre de synapses silencieuses (Malenka et Nicoll, 1999 ; Huang et coll., 2009). Ces synapses silencieuses contiennent beaucoup de récepteurs NMDA, mais peu de récepteurs AMPA, et sont majoritairement des synapses nouvellement formées et immatures (Sheng et coll., 1994 ; Elias et coll., 2008). Au fur et à mesure du sevrage, les épines nouvellement formées soit se rétractent, soit se stabilisent en épines en 'champignon' (Shen et coll., 2009), ces dernières exprimant un plus grand nombre de récepteurs AMPA membranaires contenant la sous-unité GluR1 (Boudreau et Wolf, 2005 ; Boudreau et coll., 2007 ; Conrad et coll., 2008). Ces différentes neuroadaptations pourraient notamment soutenir l'incubation du '*craving*' observée suite au sevrage. Les modifications structurales et synaptiques précédemment décrites retournent rapidement à l'état initial suite à une réexposition à la drogue. En effet, après une brève augmentation de la taille des épines, associée à une augmentation du nombre de récepteurs AMPA membranaires (Anderson et coll., 2008), on observe 2 h après l'injection de cocaïne une restructuration des épines qui redeviennent des épines 'fines' (Shen et coll., 2009), contenant peu de récepteurs AMPA membranaires (Boudreau et coll., 2007) et présentant une LTD (Kourrich et coll., 2007) (voir figure 14, page 50 du manuscrit).

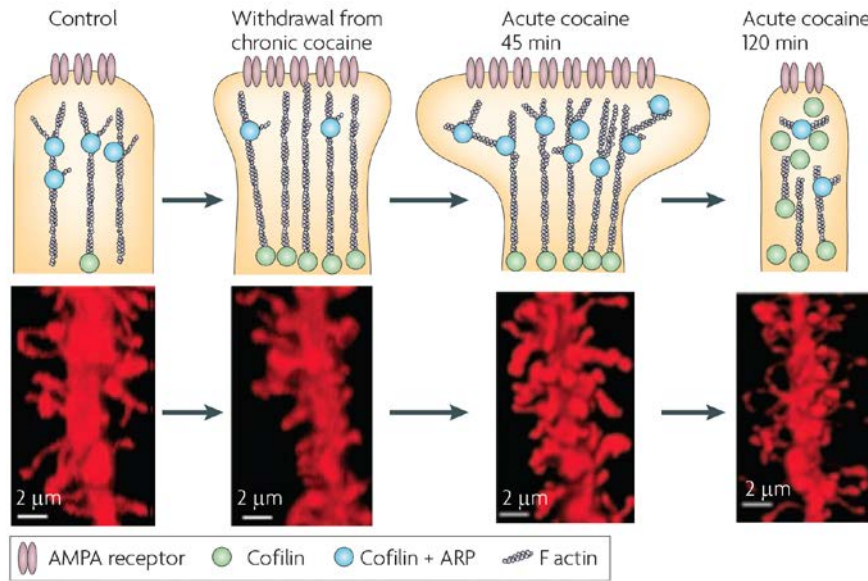


Figure 14 : **Evolution de la taille des épines dendritiques et du nombre de récepteurs AMPA membranaires suite à un traitement chronique par la cocaïne et à une période de sevrage** (tirée de Kalivas, 2009)

Rapidement après la dernière injection de cocaïne, on observe une augmentation du nombre d'épines 'fines', contenant peu de récepteurs AMPA membranaires. Au cours du sevrage, les épines se stabilisent et expriment un plus grand nombre de récepteurs AMPA membranaires. Une réexposition aiguë à la drogue au cours du sevrage induit une augmentation transitoire de la taille des épines dendritiques et du nombre de récepteurs AMPA membranaires (observable 45 min après l'administration de cocaïne), suivie d'une restructuration des épines en épines 'fines', contenant peu de récepteurs AMPA membranaires (observable 2 h après l'administration de cocaïne).

F actin, filaments d'actine ; *Cofilin et ARP*, protéines interagissant et régulant le cytosquelette d'actine.

En conclusion, la prise chronique de cocaïne est donc associée à des phénomènes de plasticité structurale et synaptique dans les principales structures du système de récompense. Bien que certaines études les présentent plutôt comme un mécanisme homéostatique compensatoire à la prise de drogue ou un épiphénomène, qui ne sous-tendrait nullement la dépendance, la majorité des études sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces phénomènes de plasticité induits par la cocaïne seraient à l'origine des comportements liés à la dépendance.

Au vu de l'ensemble des données présentées dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à une protéine fortement impliquée dans les processus de plasticité synaptique et structurale, la protéine phosphatase de type 1 (PP1), qui, en outre, se situe au cœur des voies de signalisation mises en jeu dans le striatum par l'activation des récepteurs D1 de la DA et des récepteurs NMDA du Glu. PP1 est donc susceptible de participer aux effets immédiats mais également à long-terme de la cocaïne.

CHAPITRE 2

PROTEINE PHOSPHATASE 1, PLASTICITE ET COCAÏNE

CHAPITRE 2

PROTEINE PHOSPHATASE 1, PLASTICITE ET COCAÏNE

L'activité d'un tiers des protéines eucaryotes environ est contrôlée par la phosphorylation de résidus sérine (Ser), thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr). Ces phosphorylations sont réversibles, ce qui implique que le niveau de phosphorylation résulte d'un équilibre fin entre activités kinasiques et phosphatasiques. Le génome de mammifères code une centaine de protéine Tyr kinases et phosphatases, alors que l'on dénombre environ 400 Ser/Thr protéine kinases pour seulement 40 Ser/Thr protéine phosphatases (Plowman et coll., 1999 ; pour revue : Moorhead et coll., 2007), ce qui illustre des stratégies évolutives différentes (Ceulemans et coll., 2002) ; le nombre de Ser/Thr kinases n'a pas cessé d'augmenter au cours de l'évolution des organismes eucaryotes, alors qu'on observe plutôt une importante diversification des partenaires régulateurs des Ser/Thr phosphatases.

Les Ser/Thr protéine phosphatases sont couramment divisées en trois familles (pour revue : Shi, 2009). La famille PPM (*'Metal-dependent Protein Phosphatases'*) est constituée d'enzymes dépendant des ions manganèse/magnésium (Mn^{2+}/Mg^{2+}) et comprend notamment la protéine phosphatase 2C (PP2C). La famille FCP/SCP (*'Aspartate-based phosphatases'* : *'TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD Phosphatase'* / *'Small CTD Phosphatase'*) est composée de ces deux membres. Les enzymes de cette famille utilisent un mécanisme catalytique lié à l'aspartate. Les autres Ser/Thr protéine phosphatases appartiennent à la famille PPP (*'PhosphoProtein Phosphatases'*), constituée des sous-familles PP1, PP2A (incluant aussi PP4 et PP6), PP2B, PP5 et PP7, qui présentent toutes une similarité au niveau de leur structure et de leur mécanisme catalytique. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons principalement sur PP1 (pour revue : Ceulemans et Bollen, 2004).

I. Présentation de la sérine/thréonine protéine phosphatase 1

La régulation des principales voies du métabolisme intermédiaire des cellules peut être expliquée par l'implication de seulement quatre Ser/Thr protéine phosphatases, qui peuvent être réparties en 2 classes, les protéine phosphatases de type 1 et 2, selon qu'elles déphosphorylent la sous-unité α ou β de la phosphorylase kinase. Les protéine phosphatases de type 1 (PP1) déphosphorylent la sous-unité β de la phosphorylase kinase et sont inhibées par deux protéines thermostables, Inhibiteur-1 (I1) et Inhibiteur-2 (I2). Au contraire, les protéine phosphatases de type 2 (PP2A, 2B et 2C) déphosphorylent préférentiellement la sous-unité α de la phosphorylase kinase et sont insensibles à I1 et I2 (Ingebritsen et Cohen, 1983).

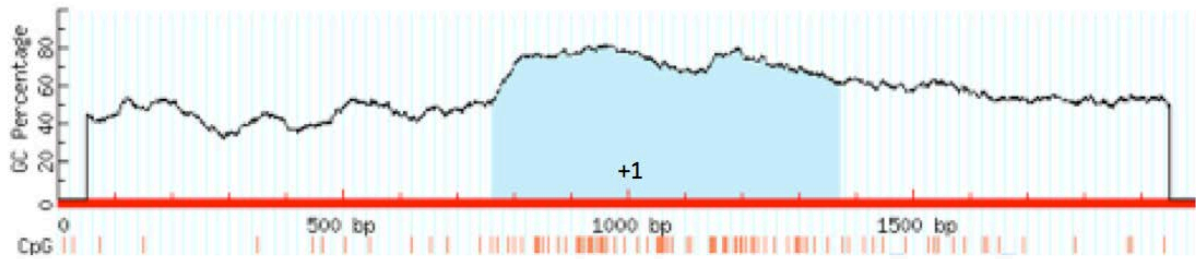
PP1 est l'une des protéines eucaryotes les mieux conservées. En effet, l'un des branchements eucaryotes les plus précoces, *Giardia lamblia*, exprime une isoforme de PP1 identique à 72% aux isoformes de PP1 présentes chez les mammifères (Ceulemans et coll., 2002). Les phénotypes associés à des mutations de PP1 chez les champignons pouvant être partiellement compensés par l'expression d'isoformes de PP1 de mammifères, PP1 est également l'une des protéines eucaryotes dont la fonction est la mieux conservée (Doonan et coll., 1991 ; Sangrador et coll., 1998).

A. Sous-unités catalytiques de PP1

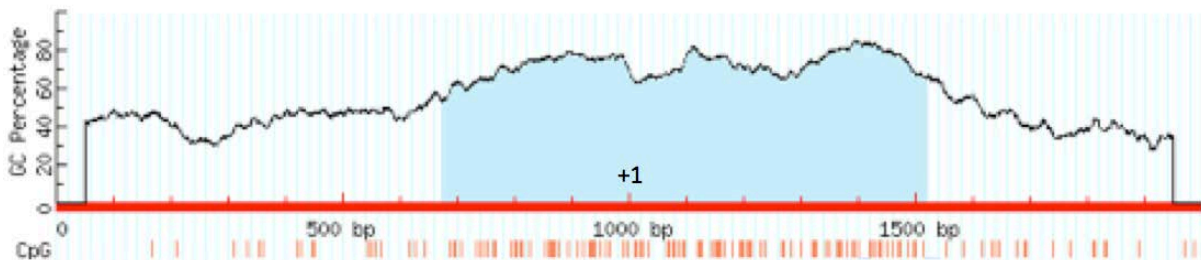
Les mammifères possèdent trois gènes PP1, qui codent les sous-unités catalytiques α , β et γ . Deux variants sont obtenus par épissage alternatif du gène *PP1C γ* , *PP1C γ 1* et *C γ 2*. A l'exception de l'isoforme *PP1C γ 2* majoritairement exprimée dans les testicules, les différentes isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire au sein de l'organisme des mammifères.

L'analyse de la région promotrice de chacun de ces trois gènes révèle la présence d'une région riche en dinucléotides CpG appelée 'îlot CpG', celui-ci étant classiquement défini par une longueur d'au moins 200 paires de bases, contenant au moins 50% de CG et présentant un rapport « CpG observés / CpG attendus » supérieur à 0,6 (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). La recherche d'îlots CpG a été effectuée avec le logiciel MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) sur une région de 2kb s'étendant de -1kb à +1kb autour du site d'initiation de la transcription (+1). Les résultats de la recherche sont représentés dans la figure 15.

Gène *PP1C α* : un îlot CpG de 607bp.



Gène *PP1C β* : un îlot CpG de 846bp.



Gène *PP1C γ* : un îlot CpG de 766bp.

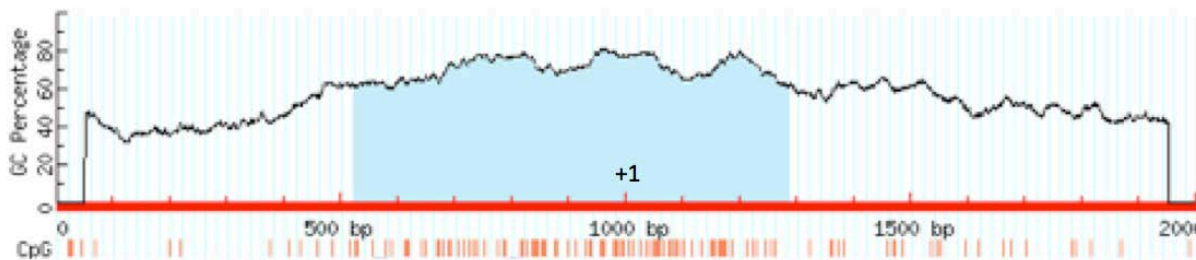


Figure 15 : Représentation des îlots CpG au niveau de la région promotrice de chacun des trois gènes *PP1C α* , *PP1C β* et *PP1C γ* de Rat

Les îlots CpG sont matérialisés en bleu. Leur recherche a été effectuée sur une région de 2000bp, s'étendant de -1000bp à +1000bp autour du site d'initiation de la transcription, noté +1 sur la figure. La position de chacun des dinucléotides CpG est représentée par un trait vertical rouge.

Les critères de recherche sélectionnés sont : une taille d'au moins 200bp, un %CG supérieur à 60% et un rapport « CpG observés / CpG attendus » supérieur à 0,6.

Les séquences des gènes *PP1C α* , *β* et *γ* sont fortement homologues, à l'exception de leurs extrémités 5' et 3'. Ils codent par conséquent des protéines présentant une séquence d'acides aminés hautement similaire, comme en témoigne le triple alignement de séquences ci-après, réalisé avec le logiciel Toffee (http://tcoffee.vital-it.ch/Tmp/TCOR/tcfTCOR11068_10913_file_result.html). Les seules variabilités observées sont situées au

niveau des régions N- et C-terminales, régions de ce fait utilisées pour la génération d'anticorps spécifiques de chacune des sous-unités catalytiques.

Liste des références des séquences utilisées pour le triple alignement :

PP1 α >gi|13928710|ref|NP_113715.1| Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform [Rattus norvegicus]

PP1 β >gi|38303861|gb|AAH62033.1| Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform [Rattus norvegicus]

PP1 γ >gi|220871|dbj|BAA14196.1| Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform [Rattus norvegicus]

Triple alignement des séquences d'acides aminés des isoformes α , β et γ :

```

gi|13928710|ref|NP_113715.1| MSDSEKLNLDLSIIGRLLEVQGSRPGKNVQLTENEIRGLCLKSREIFLSQP
gi|38303861|gb|AAH62033.1| MADGE-LNVDSLITRLLLEVRGCRPGKIVQMTEAEVRGLCIKSREIFLSQP
gi|220871|dbj|BAA14196.1| MADIDKLNIDSIIQRLLLEVRGSKPGKNVQLQENEIRGLCLKSREIFLSQP
*: * : **: **: * *****:*. : ** * : * : *****:*****

gi|13928710|ref|NP_113715.1| ILLELEAPLKICGDIHGQYYDLLRRLFYGGFPPESNYFLGDYVDRGKQS
gi|38303861|gb|AAH62033.1| ILLELEAPLKICGDIHGQYTDLLRRLFYGGFPPEANYFLGDYVDRGKQS
gi|220871|dbj|BAA14196.1| ILLELEAPLKICGDIHGQYYDLLRRLFYGGFPPESNYFLGDYVDRGKQS
*****:*****:*****

gi|13928710|ref|NP_113715.1| LETICLLLAYKIKYPENFFLLRGNHECASINRIYGFYDECKRRYNIKLWK
gi|38303861|gb|AAH62033.1| LETICLLLAYKIKYPENFFLLRGNHECASINRIYGFYDECKRRFNIKLWK
gi|220871|dbj|BAA14196.1| LETICLLLAYKIKYPENFFLLRGNHECASINRIYGFYDECKRRYNIKLWK
*****:*****

gi|13928710|ref|NP_113715.1| TFTDCFNCLPIAAIVDEKIFCCHGGLSPDLQSMEQIRRIMRPTDVPDQGL
gi|38303861|gb|AAH62033.1| TFTDCFNCLPIAAIVDEKIFCCHGGLSPDLQSMEQIRRIMRPTDVPDTGL
gi|220871|dbj|BAA14196.1| TFTDCFNCLPIAAIVDEKIFCCHGGLSPDLQSMEQIRRIMRPTDVPDQGL
***** **

gi|13928710|ref|NP_113715.1| LCDLLWSDPDKDVQGWGENDRGVSFTFGAEVVAKFLHKHDLDLICRAHQV
gi|38303861|gb|AAH62033.1| LCDLLWSDPDKDVQGWGENDRGVSFTFGADVVSKFLNRHDLDLICRAHQV
gi|220871|dbj|BAA14196.1| LCDLLWSDPDKDVLGWGENDRGVSFTFGAEVVAKFLHKHDLDLICRAHQV
*****:*****:*****

gi|13928710|ref|NP_113715.1| VEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPAD
gi|38303861|gb|AAH62033.1| VEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGGMSVDETLMCSFQILKPSE
gi|220871|dbj|BAA14196.1| VEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYCGEFDNAGAMMSVDETLMCSFQILKPAE
*****:*****:

gi|13928710|ref|NP_113715.1| KNGKYGQFSGLNPGGRPITPPRN--SAKAKK
gi|38303861|gb|AAH62033.1| KKA-KY-QYGLN-SGRPVTTPRTA-NPPKKR
gi|220871|dbj|BAA14196.1| KKKP-----N-ATRPVTPPRGMITKQAKK
*:          * . **: ***** . *:

```

Figure 16 : Triple alignement des séquences d'acides aminés des isoformes PP1 α , β et γ de Rat

De haut en bas : séquence d'acides aminés de PP1 α (>gi|13928710|ref|NP_113715.1|), PP1 β (>gi|38303861|gb|AAH62033.1|) et PP1 γ (>gi|220871|dbj|BAA14196.1|).

Les astérisques matérialisent les acides aminés identiques entre les trois isoformes.

En accord avec cette forte homologie de séquence, les différentes isoformes de PP1 présentent des cinétiques catalytiques et des profils d'inhibition *in vitro* similaires, ainsi qu'une même spécificité de substrats (Zhang et coll., 1993).

La structure cristallographique des sous-unités catalytiques de PP1 des mammifères est présentée ci-dessous, avec notamment la mise en évidence du site catalytique.

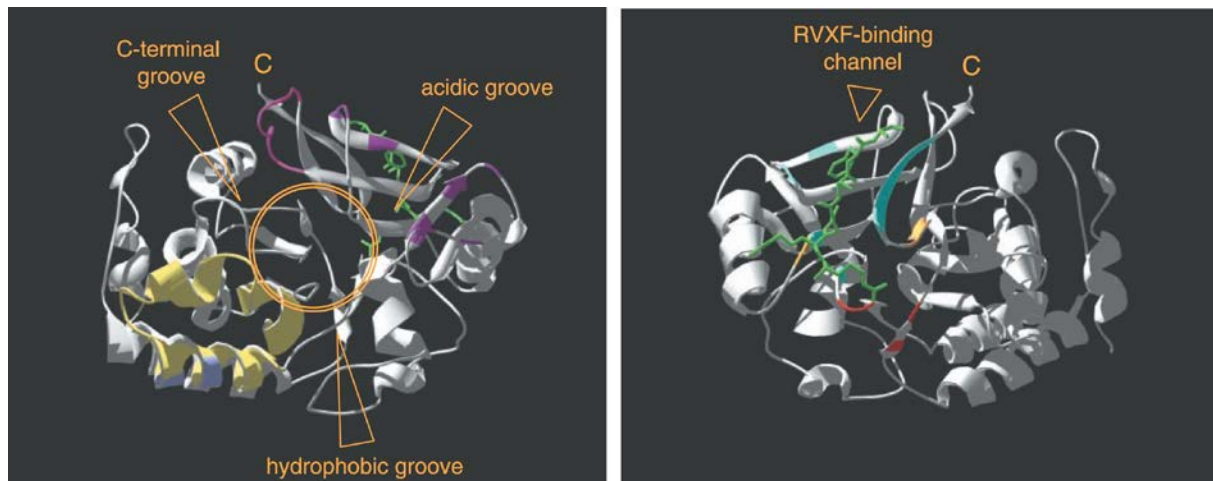


Figure 17 : **Structure cristallographique des sous-unités catalytiques de PP1** (tirée de Ceulemans et Bollen, 2004)

A gauche, vue frontale de PP1C γ avec le site catalytique (matérialisé par un cercle orange) et les 3 boucles émanant du site catalytique (signalées par des flèches oranges).

A droite, vue dorsale de PP1C γ liée à un de ses partenaires régulateurs (en vert). Le site de liaison de la sous-unité catalytique PP1C γ (domaine 'RVXF') à ses partenaires régulateurs est indiqué par une flèche orange.

B. Partenaires régulateurs de PP1

On ne trouve pas de sous-unités catalytiques de PP1 à l'état libre dans les cellules. Elles sont associées à une multitude de partenaires régulateurs (voir tableau 3, pages 59 et 60 du manuscrit), formant ainsi une grande variété d'holoenzymes multimériques. Ces différents partenaires sont répartis selon leur fonction (Bollen, 2001) :

- les régulateurs de l'activité phosphatase de PP1 : inhibiteurs endogènes de PP1 comme DARPP-32, I1, I2, NIPP1 (inhibiteur nucléaire)
- les partenaires permettant le ciblage des sous-unités catalytiques vers leurs substrats comme les Mypts ('*Myosine phosphatase targeting subunits*'), les sous-unités G
- les substrats comme les Aurora kinases ou Nek2.

La majorité des régulateurs de PP1 contient un domaine 'RVXF' (*R*, arginine ; *V*, valine ; *X*, n'importe quel acide aminé ; *F*, phénylalanine) de liaison aux sous-unités catalytiques de PP1 (Egloff et coll., 1997 ; Zhao et Lee, 1997 ; Ceulemans et coll., 2002 ; Wakula et coll., 2003). La liaison au motif 'RVXF' n'est pas associée à des changements conformationnels majeurs de PP1 et n'a pas d'effet significatif sur l'activité catalytique ; elle servirait plutôt d'ancrage pour une liaison primaire des sous-unités régulatrices à PP1 et favoriserait alors la liaison des partenaires régulateurs à des sites secondaires (Bollen, 2001 ; Wakula et coll., 2003).

Il est intéressant de préciser que certains partenaires régulateurs, comme les Neurabines, les Mypts ou encore la protéine tau, interagissent préférentiellement avec certaines sous-unités catalytiques de PP1, suggérant l'existence de sites de liaison isoformes-spécifiques. Cette spécificité de partenaires permet de cibler les sous-unités catalytiques de PP1 dans des compartiments subcellulaires particuliers, et définit par conséquent les substrats à déphosphoryler.

Protein	Gene	Docking motif				Function ⁴	Reference
		RVxF	SILK	MyPhoNE	IDP ³		
AKAP149	<i>AKAP1</i>	+			+	T	[S1]
AKAP220	<i>AKAP11</i>	+			+	T	[S2]
AKAP450	<i>AKAP9</i>	+			-	T	[S3]
APC	<i>APC</i>	+			+	?	[S4]
Aurora-A	<i>AURKA</i>	+			+	S	[S5]
Aurora-B	<i>AURKB</i>	+			-	?	[S6]
AXIN	<i>AXIN1</i>	-				S	[S7]
BCL2	<i>BCL2</i>	+			-	T	[S8]
BCL-w	<i>BCL2L2</i>	+			-	T	[S9]
BCL-x	<i>BCL2L1</i>	+			-	T	[S9]
BRCA1	<i>BRC A1</i>	+			+	S	[S10]
CASC1	<i>CASC1</i>	+			-	?	[S11]
CASC5	<i>CASC5</i>	+	+		+	?	[S11]
Caspase 9	<i>CASP9</i>	-				S	[S12]
Caspase 2 ⁵	<i>CASP2</i>	+				S	[S13]
Chapsyn110	<i>DLG2</i>	+			-	?	[S11]
CCDC8	<i>CCDC8</i>	+			+	?	[S11]
CCDC128	<i>CCDC128</i>	+			+	?	[S11]
CD2BP2	<i>CD2BP2</i>	+			+	?	[S11]
CDC25C ⁵	<i>CDC25C</i>	+				S	[S14]
CENPE	<i>CENPE</i>	+			-	?	[S11]
CEP192	<i>CEP192</i>	+			+	?	[S11]
CHCHD3	<i>CHCHD3</i>	+			+	?	[S11]
CHCHD6	<i>CHCHD6</i>	+			+	?	[S11]
CLC7	<i>CLCN7</i>	+			+	?	[S4]
Consortin	<i>CNST</i>	+	+		+	?	[S11]
CPI-17	<i>PPP1R14A</i>	-				I	[S15]
CSMD1	<i>CSMD1</i>	+			+	?	[S11]
DARPP32	<i>PPP1R1B</i>	+			+	I	[S16]
dead box31	<i>DDX31</i>	+			+	?	[S11]
DNAPolI _{p68}	<i>POLD3</i>	+			+	S	[S17]
DRIM BP	<i>KIAA0649</i>	+			+	?	[S11]
DYSFIP1	<i>DYSFIP1</i>	+			-	?	[S11]
DZIP3	<i>DZIP3</i>	+			+	?	[S11]
eIF2 β	<i>EIF2S2</i>	+			+	?	[S18]
ELFN1	<i>ELFN1</i>	+			+	?	[S11]
ELFN2	<i>ELFN2</i>	+			-	?	[S11]
ELL1	<i>ELL</i>	+			-	?	[S11]
Endofin	<i>ZFYVE16</i>	+			+	T	[S19]
Endophilin B1t	<i>SH3GLB1</i>	+			-	?	[S20]
FAK	<i>PTK2</i>	-				S	[S21]
FAM130A1	<i>FAM130A1</i>	+	+		+	?	[S11]
FAM130A2	<i>FAM130A2</i>	+	+		+	?	[S11]
FER kinase	<i>FER</i>	+			-	?	[S22]
FERM	<i>FARP1</i>	+			+	?	[S11]
FK506BP15	<i>FKBP15</i>	+			+	?	[S11]
FLJ14744	<i>PPP1R15B</i>	+			-	?	[S23]
14-3-3gamma	<i>YWHAG</i>	-				?	[S24]
GADD34	<i>PPP1R15A</i>	+			+	T	[S25]
GBPI-1	<i>PPP1R14D</i>	+			+	I	[S26]
GL	<i>PPP1R3B</i>	+			-	T	[S27]
GM	<i>PPP1R3A</i>	+			+	T	[S28]
GPATCH2	<i>GPATCH2</i>	+			+	?	[S11]
GPR12	<i>GPR12</i>	+			-	?	[S11]
Glutaredoxin	<i>GRXCR1</i>	+			+	?	[S11]
G-substrate	<i>C7orf16</i>	-				I	[S29]

Protein	Gene	Docking motif				Function ⁴	Reference
		RVxF	SILK	MyPhoNE	IDP ³		
HB2E	<i>PPP1R3F</i>	+			+	T	[S23]
HCF1	<i>HCF1</i>	-				?	[S30]
HDAC6	<i>HDAC6</i>	-				?	[S31]
HYDIN	<i>HYDIN</i>	+			+	?	[S11]
IIIg9	<i>C11orf66</i>	+			+	?	[S11]
Ikaros	<i>IKZF1</i>	+			+	S	[S32]
Inhibitor-1	<i>PPP1R1A</i>	+			+	I	[S33]
Inhibitor-2	<i>PPP1R2</i>	+	+		+	I, S	[S34]
Inhibitor-3	<i>PPP1R11</i>	+			+	I	[S35]
Integrin α IIb	<i>ITGA2B</i>	+			+	T	[S36]
IP3R1	<i>ITPR1</i>	+			-	?	[S4]
IP3R3	<i>ITPR3</i>	+			-	?	[S4]
IPP5	<i>PPP1R1C</i>	+			+	I	[S37]
IRBIT	<i>AHCYL1</i>	+			+	S	[S38]
JARID1B	<i>JARID1B</i>	+			-	?	[S11]
KCNA6	<i>KCNA6</i>	+			-	?	[S4]
KCNK10	<i>KCNK10</i>	+			-	?	[S11]
KEPI	<i>PPP1R14C</i>	+			+	I	[S39]
KIAA1244	<i>KIAA1244</i>	+			-	?	[S11]
KIAA1443	<i>PPP1R3E</i>	+			+	T?	[S23]
KPI-2	<i>LMTK2</i>	+			+	?	[S40]
L5	<i>RPL5</i>	-				?	[S41]
LIMKAIN b1	<i>KIAA0430</i>	+			-	?	[S11]
LMTK1	<i>AATK</i>	+			+	T	[S42]
LMTK3	<i>LMTK3</i>	+			+	?	[S11]
LOC221908	<i>C7orf47</i>	+			+	?	[S11]
LOC145376	<i>C14orf50</i>	+			-	?	[S11]
LRRC68	<i>LRRC68</i>	+			+	?	[S11]
MAP1B	<i>MAP1B</i>	+			+	?	[S11]
MCM7	<i>MCM7</i>	+			-	?	[S11]
mGlu1	<i>GRM1</i>	+			+	?	[S43]
mGlu5	<i>GRM5</i>	+			+	?	[S43]
mGlu7	<i>GRM7</i>	+			-	?	[S43]
MKI67	<i>MKI67</i>	+			+	?	[S11]
MPHOSPH10	<i>MPHOSPH10</i>	+			+	?	[S11]
MYPT 1	<i>PPP1R12A</i>	+	+	+	+	T	[S44]
MYPT 2	<i>PPP1R12B</i>	+	+	+	+	T	[S45]
MYPT 3	<i>PPP1R16A</i>	+	+	+	+	T	[S46]
myosin1D	<i>MYO1D</i>	+			-	?	[S11]
MYR 8	<i>MYO16</i>	+			+	T	[S47]
N-Cor	<i>NCOR1</i>	+			+	S	[S48]
NEK2a	<i>NEK2</i>	+			+	S, T	[S49]
neurabin-I	<i>PPP1R9A</i>	+			+	T	[S50]
neurofilament L	<i>NEFL</i>	-				T?	[S51]
NEZHa2	<i>KIAA1543</i>	+			+	?	[S11]
NHE1	<i>SLC9A1</i>	-				T	[S52]
NIPP1	<i>PPP1R8</i>	+			+	?	[S53]
NIR	<i>NOC2L</i>	+			+	S	[S30]
NKCC1	<i>SLC12A2</i>	+			+	T	[S54]
NOM1	<i>NOM1</i>	+			+	S	[S55]
Occludin	<i>OCN</i>	-				?	[S56]
Opsin 3	<i>OPN3</i>	+			-	?	[S4]
ORC5L	<i>ORC5L</i>	+			-	?	[S11]
p53BP2	<i>PPP1R13A</i>	+			+	?	[S57]
p53BP2like	<i>PPP1R13B</i>	+			+	T	[S23]
p84	<i>PPP1R12C</i>	+			+	S	[S58]

Protein	Gene	Docking motif				Function ⁴	Reference ⁵
		RVxF	SILK	MyPhoNE	IDP ³		
PAR-3	<i>PARD3</i>	+			+	S	[S59]
PCIF1	<i>PCIF1</i>	+			-	?	[S11]
PFK-1	<i>PFKM</i>	-				?	[S60]
PHACTR1-4	<i>PHACTR4</i>	-				?	[S61]
PHI-1	<i>PPP1R14B</i>	+ ⁶			+	I	[S62]
Phostensin	<i>KIAA1949</i>	+			+	T	[S63]
PHRF1	<i>PHRF1</i>	+			+	?	[S11]
PITK	<i>ANKRD28</i>	+			-	T	[S64]
PKMYT1	<i>PKMYT1</i>	+			+	?	[S11]
PKR	<i>EIF2AK2</i>	-				S	[S65]
PMP22cd	<i>PMP22CD</i>	+			-	?	[S11]
PNUTS	<i>PPP1R10</i>	+			+	T	[S66]
pREX2	<i>DEPDC2</i>	+			-	?	[S11]
PRIP-1	<i>PLCL1</i>	+			+	?	[S67]
Protocadherin 7	<i>PCDH7</i>	+			+	?	[S68]
Protocadherin11x	<i>PCDH11X</i>	+			+	?	[S11]
PSF	<i>SFPQ</i>	+			+	?	[S69]
PTG	<i>PPP1R3C</i>	+			-	T	[S70]
R6	<i>PPP1R3D</i>	+			+	T	[S71]
RB	<i>RB1</i>	+			+	S	[S72]
RB1CC1	<i>RB1CC1</i>	+			-	?	[S4]
RBM26	<i>RBM26</i>	+			+	?	[S11]
Repo-man	<i>CDCA2</i>	+			+	T	[S73]
RIMBP2	<i>RIMBP2</i>	+			-	?	[S11]
RPGRIP1L	<i>RPGRIP1L</i>	+			+	?	[S11]
RRP1B	<i>RRP1B</i>	+			+	?	[S11]
Ryanodine receptor	<i>RYR1</i>	+			-	S	[S74]
SACSIN	<i>SACS</i>	+			-	?	[S11]
SARA	<i>ZFYVE9</i>	+			-	T	[S75]
SARP	<i>ANKDR42</i>	+			+	?	[S76]
Scapinin	<i>PHACTR3</i>	-				?	[S77]
SDS22	<i>PPP1R7</i>	-				?	[S78]
SFI1	<i>SFI1</i>	+			+	?	[S11]
SH2D4A	<i>SH2D4A</i>	+			+	?	[S11]
SH3RF2	<i>SH3RF2</i>	+			+	?	[S11]

Protein	Gene	Docking motif				Function ⁴	Reference ⁵
		RVxF	SILK	MyPhoNE	IDP ³		
SIPP1	<i>WBP11</i>	+	+		+	?	[S79]
SNF5	<i>SMARCB1</i>	+ ⁶			-	?	[S80]
Solute carrier 7-14	<i>SLC7A14</i>	+			-	?	[S11]
SPATA2	<i>SPATA2</i>	+			-	?	[S11]
Spinophilin	<i>PPP9B</i>	+			+ ⁷	T	[S81]
SPOCD1	<i>SPOCD1</i>	+			+	?	[S11]
SPRED1	<i>SPRED1</i>	+			+	?	[S11]
SPZ1	<i>SPZ1</i>	-				?	[S82]
SRp38	<i>SFRS13</i>	-				S	[S83]
Staufen	<i>STAU</i>	+			+	?	[S84]
SAP102	<i>DLG3</i>	+			-	?	[S11]
SYTL2	<i>SYTL2</i>	+	+		+	?	[S11]
TAU	<i>MAPT</i>	-				S	[S85]
Tensin 1	<i>TNS1</i>	+			+	?	[S86]
TIMAP	<i>PPP1R16B</i>	+	+		-	T	[S87]
TMEM132C	<i>TMEM132C</i>	+			+	?	[S11]
TMEM132D	<i>TMEM132D</i>	+			-	?	[S11]
TRA-2BETA	<i>TRA2B</i>	+			+	?	[S88]
TRIM42	<i>TRIM42</i>	+			-	?	[S11]
TRPC4AP	<i>TRPC4AP</i>	+			-	?	[S11]
TRP5	<i>TRPC5</i>	+			+	?	[S4]
TSC2	<i>TSC2</i>	+			+	?	[S11]
TSKS	<i>TSKS</i>	+			+	?	[S11]
Ubiquitin 1	<i>UBN1</i>	+			+	?	[S11]
URI	<i>C19orf2</i>	-				T	[S89]
Vitamin D receptor	<i>VDR</i>	-				?	[S90]
VPS54	<i>VPS54</i>	+			+	?	[S11]
WDR81	<i>WDR81</i>	+			+	?	[S11]
WNK1	<i>WNK1</i>	+			+	?	[S11]
ZAP3	<i>YLPM1</i>	+			+	T	[S91]
ZBTB38	<i>ZBTB38</i>	+			+	?	[S11]
ZCCHC9	<i>ZCCHC9</i>	+			-	?	[S11]
ZFYVE1	<i>ZFYVE1</i>	+			-	?	[S11]
ZSWIM3	<i>ZSWIM3</i>	+			-	?	[S11]

Tableau 3 : Partenaires régulateurs de PP1
(tiré de Bollen et coll., 2010)

Du fait de cette grande variété de partenaires régulateurs, PP1 est impliquée dans une multitude de processus cellulaires, *via* la déphosphorylation d'un grand nombre de substrats. Elle intervient en effet dans les processus de division cellulaire et de méiose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, le métabolisme cellulaire, la synthèse protéique, la réorganisation des filaments d'actine et de l'actomyosine, ainsi que la régulation de certains récepteurs, canaux et pompes ioniques. Dans la suite de ce chapitre, nous nous limiterons aux rôles de PP1 dans l'encéphale de mammifères, et plus particulièrement à ceux liés aux processus de plasticité.

II. Localisations des différentes sous-unités catalytiques de PP1 dans l'encéphale de mammifères

Les différentes sous-unités catalytiques de PP1 sont exprimées dans l'ensemble des régions de l'encéphale de mammifères, les niveaux d'expression les plus importants étant observés dans le striatum et la formation hippocampique (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999). On note cependant une localisation cellulaire et subcellulaire différentielle entre les sous-unités α , β et γ .

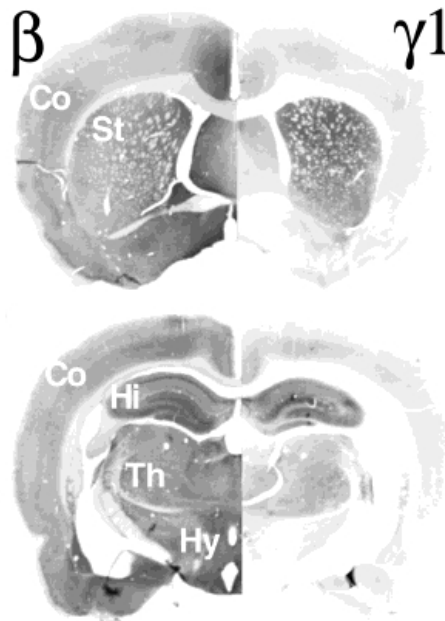


Figure 18 : Localisations des sous-unités catalytiques β et $\gamma 1$ de PP1 dans l'encéphale de Rat (tirée de Strack et coll., 1999)

Hémisections coronales d'encéphale de Rat au niveau du striatum (en haut) et de l'hippocampe (en bas).

Co, cortex cérébral ; *St*, striatum ; *Hi*, hippocampe ; *Th*, thalamus ; *Hy*, hypothalamus.

A. Localisations cellulaires des différentes isoformes de PP1

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons uniquement à l'expression des différentes sous-unités catalytiques de PP1 au sein du striatum, du cortex cérébral et de l'hippocampe.

Des études réalisées par da Cruz e Silva et coll. en 1995 et par Strack et coll. en 1999 ont permis de montrer, à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre chacune des isoformes, que PP1C β et PP1C γ 1 sont les plus exprimées au sein de l'encéphale, et que les différentes sous-unités présentent une localisation cellulaire différentielle. Dans le striatum, on observe une expression des sous-unités α et γ 1 dans les neurones épineux de taille moyenne, alors que PP1C β semble plutôt localisée dans des neurones de grande taille, vraisemblablement des interneurones cholinergiques géants. Au sein de l'hippocampe, les trois sous-unités catalytiques sont présentes dans les cornes d'Ammon (CA) 1 à 4, ainsi que dans le gyrus denté (DG). PP1C γ 1 est notamment exprimée dans l'ensemble des couches des CA et du DG. Au contraire, on observe des taux d'expression modérés de PP1C β dans les corps cellulaires des cellules pyramidales et des cellules granulaires du DG, et une immunoréactivité plus forte dans les corps cellulaires des neurones de la stratum radiatum et du hile du DG. Au niveau cortical, les isoformes β et γ 1 présentent par contre des profils d'expression similaires. Elles sont localisées dans l'ensemble des couches du cortex cérébral, les niveaux d'expression les plus élevés étant observés dans la couche V des neurones pyramidaux.

B. Localisations subcellulaires des différentes isoformes de PP1

En plus de leur localisation cellulaire différentielle, les isoformes de PP1 présentent également des localisations subcellulaires spécifiques. PP1C α et C γ 1 sont majoritairement exprimées dans les épines dendritiques, et notamment au niveau des densités post-synaptiques (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999 ; Muly et coll., 2001 ; Bordelon et coll., 2005). On observe par ailleurs une co-localisation des immunomarquages de PP1C γ 1 et de la synaptophysine, un marqueur des terminaisons pré-synaptiques, ce qui indique donc que PP1C γ 1 est à la fois présent dans les compartiments pré- et post-synaptiques (Strack et coll., 1999). PP1C β , au contraire, est essentiellement localisée au niveau de la périphérie du soma des cellules, l'immunoréactivité PP1C β formant un cercle interrompu par des 'paquets' de microtubules s'étendant dans les principales dendrites (Strack et coll., 1999). Une étude réalisée dans le cortex préfrontal de primates a par ailleurs montré que PP1C β est également exprimée dans les dendrites, ainsi que dans l'élément pré-synaptique (Bordelon et coll., 2005).

Les différentes sous-unités catalytiques de PP1 sont également présentes dans le noyau des cellules (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999 ; Lontay et coll., 2004 ;

Koshibu et coll., 2009), leur distribution nucléaire étant modifiée tout au long du cycle cellulaire, ainsi qu'en réponse à des perturbations cellulaires (Moorhead et coll., 2007). Chacune des isoformes présente une distribution nucléaire particulière. PP1C α est en effet exprimée de manière diffuse et est associée à la matrice nucléaire, PP1C β est localisée au niveau de l'ensemble de la chromatine et est associée aux chromosomes, alors que PP1C γ est plutôt concentrée dans le nucléole et est associée aux microtubules du fuseau mitotique (Andreassen et coll., 1998 ; Lesage et coll., 2005 ; Moorhead et coll., 2007).

III. PP1 et plasticité cérébrale

A. PP1 et plasticité structurale

1. Implication de PP1 dans la régulation des épines dendritiques

La mobilité des épines dendritiques est régulée par un réseau de voies de signalisation impliquant des RhoGTPases (Luo, 2000 ; Ramakers, 2002), des protéine kinases et des protéine phosphatases, notamment PP1. La mise en jeu de ces voies de signalisation induit principalement une réorganisation dynamique des réseaux de microfilaments d'actine présents dans les épines (Fischer et coll., 1998). L'association de PP1 avec certains de ses partenaires régulateurs, la neurabine I et la neurabine II (également appelée spinophiline) (Strack et coll., 1997), apparaît comme essentielle dans la régulation de la mobilité des épines (Feng et coll., 2000 ; Oliver et coll., 2002).

La neurabine I et la spinophiline sont deux protéines d'échafaudage, qui contiennent plusieurs domaines d'interaction, dont un domaine de liaison à l'actine F et un domaine de liaison à PP1 (voir figure 19, page 64 du manuscrit). Les différentes sous-unités catalytiques de PP1 peuvent toutes se lier aux neurabines *via* le motif 'RVXF'. On note cependant une plus grande affinité pour les isoformes γ 1 et α par rapport à l'isoforme β (Allen et coll., 1997 ; MacMillan et coll., 1999 ; Terry-Lorenzo et coll., 2002), ce qui suggère que d'autres interactions pourraient entrer en jeu afin de dicter cette sélectivité. Le complexe PP1/spinophiline présente *in vivo* un équilibre fin entre associations et dissociations, les dissociations transitoires entre PP1 et la spinophiline permettant alors à la phosphatase de déphosphoryler les substrats à proximité (Yan et coll., 1999).

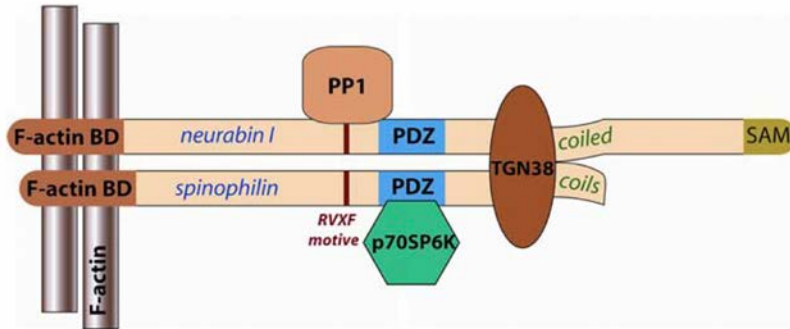


Figure 19 : **Structure de la neurabine/spinophiline** (tirée de Munton et al., 2004)

Les neurabines I et II (spinophiline) contiennent un domaine NH2-terminal de liaison à l'actine F ('F-actin BD'), un domaine central 'RVXF' de liaison à PP1, un domaine PDZ permettant la liaison de la kinase p70S6 et un domaine 'coiled coils' COOH-terminal de stabilisation des dimères de neurabines. Le domaine NH2-terminal de la spinophiline permet non seulement la liaison à l'actine F, mais également le ciblage de la protéine au niveau des épines dendritiques (Grossman et coll., 2002). La liaison de PP1 et de la kinase p70S6 est mutuellement exclusive (Oliver et coll., 2002). PP1 et p70S6K jouent un rôle antagoniste dans la régulation de la morphologie cellulaire (Crouch, 1997).

La liaison de PP1 aux neurabines permet de cibler les sous-unités catalytiques de PP1 au niveau des épines dendritiques (pour revues : Ceulemans et Bollen, 2004 ; Munton et coll., 2004 ; Sarrouilhe et coll., 2006). Cette liaison est cruciale dans la régulation de la formation et de la dynamique des épines dendritiques (Feng et coll., 2000 ; Oliver et coll., 2002), mais également dans le développement, la morphologie et la fonction des cellules nerveuses. Les souris invalidées pour le gène de la spinophiline présentent en effet une diminution de la taille de l'encéphale et une augmentation du nombre d'épines dendritiques, associées à une altération des processus de plasticité synaptique (Feng et coll., 2000).

2. PP1, stabilité des microtubules et maintien de la structure des cellules

PP1 est par ailleurs impliquée dans le maintien de la structure des synapses et de la morphologie des cellules. En effet, le traitement de cultures de neurones hippocampiques de rats par des inhibiteurs des protéine phosphatases 1 et 2A (acide okadaïque et calyculine A) induit des modifications de l'arbre neuritique, notamment une rétraction des prolongements neuronaux, associées à une perte de connexions synaptiques et à une perturbation du transport axonal. L'ensemble de ces événements pourrait être lié à l'hyperphosphorylation de la protéine tau, observée suite à l'inhibition des protéine phosphatases 1 et 2A (Malchiodi-Albedi et coll., 1997). La protéine tau est une protéine de liaison aux microtubules ou MAP

(‘*Microtubules-Associated Protein*’) impliquée dans la stimulation de la polymérisation des microtubules et leur stabilisation (Crowther et coll., 1992 ; Hirokawa, 1994 ; Schoenfeld et Obar, 1994 ; Maccioni et Cambiazo, 1995 ; Mandelkow et Mandelkow, 1995). Liao et coll. ont montré que PP1 pouvait se lier à la protéine tau, ce qui entraînait alors son recrutement au niveau des microtubules (Liao et coll., 1998). L’association de PP1 avec les microtubules provoque une déphosphorylation des MAPs, processus connu pour induire l’association des MAPs avec les microtubules et favoriser leur stabilité. Ainsi, PP1 pourrait jouer un rôle majeur dans la stabilité des microtubules, en permettant le maintien de faibles taux de phosphorylation des MAPs. Il semblerait que ce soit notamment la sous-unité catalytique β de PP1, qui interviendrait dans ces phénomènes (Strack et coll., 1999). PP2A, contrairement à PP1, se lie à la protéine tau lorsque celle-ci n’est pas associée aux microtubules (Liao et coll., 1998). Elle déphosphoryle la fraction soluble de tau, ce qui permet la réassociation de tau aux microtubules. Il pourrait donc y avoir une régulation fine des interactions tau/microtubules, PP1 et PP2A étant régulées par des voies de transduction du signal différentes.

B. PP1 et plasticité synaptique

Différentes études ont démontré l’implication de PP1 dans la régulation des récepteurs ionotropes AMPA et NMDA du Glu, et par conséquent dans les processus de plasticité synaptique.

1. PP1 et régulation des récepteurs NMDA du glutamate

Les récepteurs NMDA sont généralement constitués de deux sous-unités NR1, permettant la liaison de la glycine, et de deux sous-unités NR2, permettant la liaison du glutamate. Les courants NMDA des récepteurs contenant la sous-unité NR1A sont régulés par la PKA et par PP1, toutes deux recrutées au niveau de la sous-unité NR1A *via* la protéine d’échafaudage yotiao (voir figure 20, page 66 du manuscrit). En effet, dans des cellules HEK293 exprimant des récepteurs NMDA exogènes et la protéine yotiao, la stimulation de la PKA, tout comme l’inhibition de PP1 par l’acide okadaïque induisent une augmentation des courants NMDA (Westphal et coll., 1999). La séquestration simultanée d’une kinase et d’une phosphatase permettrait ainsi d’augmenter la vitesse et l’efficacité des modifications des courants NMDA. Le complexe PP1/spinophiline pourrait également être impliqué dans la

régulation des courants NMDA (Feng et coll., 2000). Certains récepteurs NMDA seraient donc régulés par les complexes PP1/spinophiline et d'autres par les complexes PP1/yotiao.

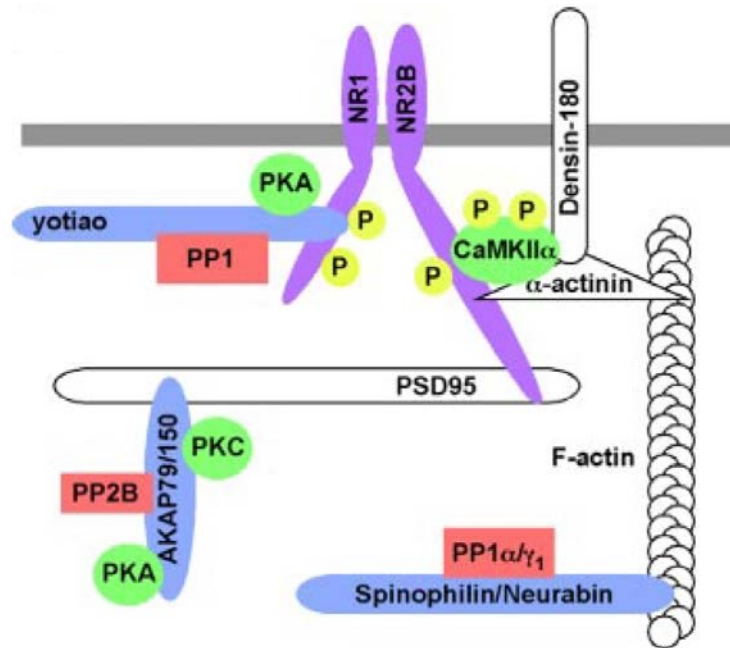


Figure 20 : Complexes PP1/neurabines et PP1/yotiao et régulation des récepteurs NMDA (tirée de Colbran, 2004)

Les sous-unités catalytiques des protéines phosphatases 1 et 2A sont représentées en rouge. Les kinases sont représentées en vert. Les sous-unités NR1 et NR2 des récepteurs NMDA sont représentées en violet. Les protéines de liaison aux protéines phosphatases sont représentées en bleu, les autres protéines d'échafaudage et du cytosquelette étant laissées en blanc. Les phosphoprotéines sont matérialisées par l'ajout de cercles jaunes.

Les récepteurs NMDA jouent un rôle central dans les processus de plasticité synaptique. En effet, bien que plusieurs types de plasticité synaptique aient été décrits, les changements d'efficacité synaptique résultent généralement de l'activation des récepteurs NMDA, suivie d'une entrée de calcium et de l'activation de protéines kinases et phosphatases (pour revue : Lisman et coll., 2002).

2. PP1 et potentialisation à long terme

La LTP est une forme de plasticité synaptique, dans laquelle l'efficacité synaptique est renforcée après une stimulation à haute fréquence (100 Hz). Ce type de stimulation, particulièrement étudié au niveau des synapses des collatérales de Schaffer dans CA1, induit

une entrée transitoire de calcium *via* les récepteurs NMDA, ce qui provoque, d'une part, l'activation soutenue de la CaMKII suite à l'autophosphorylation de la Thr 286 (Malenka et Nicoll, 1999 ; Nicoll et Malenka, 1999), et d'autre part, le recrutement de la CaMKII au niveau des densités post-synaptiques (Yoshimura et Yamauchi, 1997). L'autophosphorylation de la CaMKII est augmentée par la phosphorylation de l'inhibiteur endogène de PP1 -I1- par la PKA, entraînant l'inhibition de PP1 (Blitzer et coll., 1998) (voir figure 22 à la page 69 du manuscrit).

La LTP est associée à des modifications de l'état de phosphorylation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA du Glu. La sous-unité GluR1 peut être phosphorylée sur deux résidus, la Ser 831 et la Ser 845. A l'état basal, la phosphorylation de la Ser 845 par la PKA augmente les courants AMPA (Lee et coll., 2000). Durant la LTP, la CaMKII (activée suite à son autophosphorylation de la Thr 286) phosphoryle les sous-unités GluR1 au niveau de la Ser 831, induisant une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux (voir figure 22).

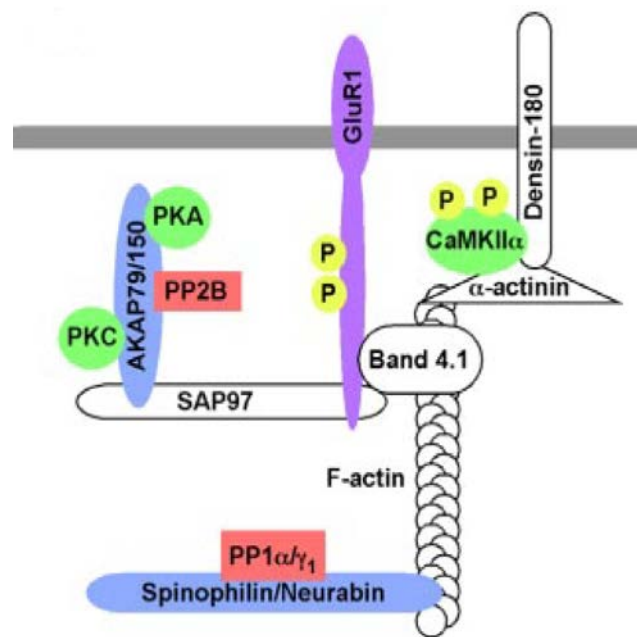


Figure 21 : **Organisation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA et des complexes impliqués dans sa régulation** (tirée de Colbran, 2004)

Les sous-unités catalytiques des protéine phosphatases 1 et 2B sont représentées en rouge. Les kinases sont représentées en vert. La sous-unité GluR1 des récepteurs NMDA est représentée en violet. Les protéines de liaison aux protéine phosphatases sont représentées en bleu, les autres protéines d'échafaudage et du cytosquelette étant laissées en blanc. Les phosphoprotéines sont matérialisées par l'ajout de cercles jaunes.

3. PP1 et dépression à long terme

Tout comme la LTP, la LTD a été majoritairement décrite dans l'hippocampe. Il s'agit d'une forme de plasticité synaptique associée à une diminution de l'efficacité synaptique suite à une stimulation à basse fréquence (1-5 Hz). Celle-ci induit une entrée modeste mais soutenue de calcium *via* les récepteurs NMDA, ce qui active la calcineurine (PP2B), qui déphosphoryle I1, empêchant l'inhibition de PP1. PP1 déphosphoryle les récepteurs AMPA au niveau de la Ser 845, ce qui diminue les courants AMPA. PP1 et la calcineurine interviendraient également dans l'internalisation des récepteurs AMPA dépendante de l'activité, un second processus impliqué dans la diminution de l'efficacité de la transmission glutamatergique observée durant la LTD. Il semblerait d'ailleurs que la déphosphorylation de la Ser 845 soit un pré-requis nécessaire à l'endocytose des récepteurs AMPA (Beattie et coll., 2000 ; Ehlers, 2000 ; Lin et coll., 2000) (voir figure 22).

Différentes études ont permis de montrer que l'association de PP1 à la spinophiline est essentielle à l'expression de la LTD. En effet, la délétion du gène de la spinophiline (souris '*Neurabin-II null*') entraîne une inhibition quasi-totale de la LTD (Feng et coll., 2000). De plus, l'utilisation de peptides capables d'empêcher l'association de PP1 à différents partenaires impliqués dans le recrutement de PP1 à la synapse, dont la spinophiline, bloque la LTD normalement induite par des stimulations à basse fréquence (Morishita et coll., 2001). Il est intéressant de préciser que ces peptides n'ont pas d'effet sur la transmission synaptique glutamatergique basale. PP1 ne régule donc pas la transmission synaptique basale, mais intervient uniquement dans la LTD dépendante de l'activité.

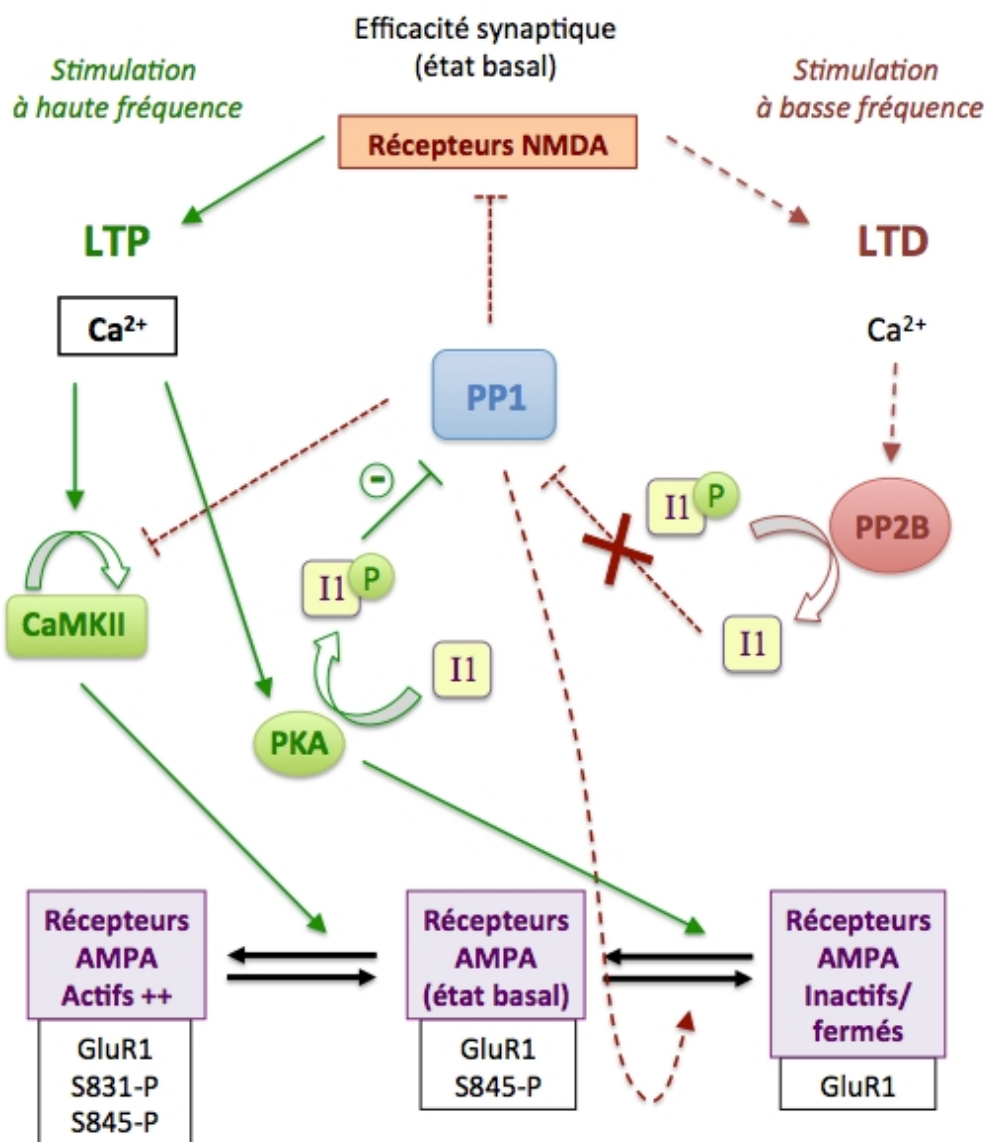


Figure 22 : **PP1 et plasticité synaptique** (adaptée de Ceulemans et Bollen, 2004)

Une stimulation à haute fréquence induit une potentialisation à long terme, liée à des modifications de l'état de phosphorylation de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA du glutamate, *via* la mise en jeu de la CaMKII, de la PKA et l'inhibition de PP1.

Une stimulation à basse fréquence induit, au contraire, une dépression à long terme, liée à une déphosphorylation des récepteurs NMDA et de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, *via* PP1, activée par la calcineurine (PP2B).

Les phosphoprotéines sont identifiées par un P.

LTP, potentialisation à long terme ; **LTD**, dépression à long terme ; **CaMKII**, 'calcium calmoduline kinase II' ; **PKA**, protéine kinase A ; **I1**, inhibiteur 1 ; **PP1**, protéine phosphatase 1 ; **PP2B**, protéine phosphatase 2B ou calcineurine ; **S**, résidu Sérine.

4. PP1 et dépotentialisation

Il existe un autre type de dépression synaptique décrit dans l'hippocampe, la dépotentialisation. Celle-ci reflète une diminution de l'efficacité des synapses potentialisées (LTP) vers le niveau basal et pourrait représenter un mécanisme mis en jeu pour empêcher la saturation de la capacité de stockage d'un réseau neuronal (Huang et coll., 2001). Tout comme la LTD, la dépotentialisation implique PP1. En effet, l'administration d'inhibiteurs pharmacologiques de PP1 empêche l'expression de la dépotentialisation.

La dépotentialisation est induite par des protocoles électrophysiologiques particuliers utilisant une stimulation à basse fréquence après une LTP. Ce type de stimulation entraîne la mise en jeu des cascades impliquant les récepteurs NMDA et des protéines phosphatases, ce qui aboutit à la déphosphorylation de la Ser 831 des sous-unités GluR1 associée à la diminution de l'autophosphorylation de la Thr 286 de la CaMKII. La déphosphorylation de la CaMKII au niveau des densités post-synaptiques est spécifiquement réalisée par PP1, cette dernière y étant séquestrée par des protéines d'échafaudage, dont la spinophiline (Shields et coll., 1985 ; Allen et coll., 1997 ; Nakanishi et coll., 1997 ; Hsieh-Wilson et coll., 1999 ; MacMillan et coll., 1999 ; Feng et coll., 2000). En effet, PP2A, une autre protéine phosphatase qui déphosphoryle pourtant la CaMKII soluble, est incapable de déphosphoryler la CaMKII localisée au niveau des densités post-synaptiques (Strack et coll., 1997).

Compte tenu du fait que PP1 est fortement exprimée dans le striatum et que la prise répétée de cocaïne y induit des phénomènes de plasticité, nous allons maintenant nous intéresser aux rôles de PP1 dans cette structure cérébrale, et plus particulièrement à son implication dans les effets de la cocaïne.

IV. PP1, striatum et cocaïne

A. Interactions DARPP-32/PP1 et intégration de multiples systèmes de neurotransmission

De nombreuses études ont montré un rôle central de PP1 et de son inhibiteur endogène, DARPP-32, dans l'intégration des différents systèmes de neurotransmission dans le striatum, en particulier dopaminergique et glutamatergique (pour revues : Greengard et

coll., 1998 ; Svenningsson et coll., 2004). Les interactions entre DARPP-32 et PP1 sont modulées par les voies de signalisation intracellulaires activées par ces neurotransmetteurs. Or, le complexe DARPP-32/PP1 contrôle l'état de phosphorylation d'une grande variété d'effecteurs physiologiques, et par conséquent régule le fonctionnement des neurones du striatum. Nous nous limiterons dans cette partie aux rôles de la DA et du Glu dans la régulation des interactions PP1/DARPP-32.

Tout comme PP1, DARPP-32 est fortement exprimé dans le striatum (CPu et NAc) (Ouimet et coll., 1984 ; Walaas et Greengard, 1984). DARPP-32 est exclusivement exprimé dans les neurones épineux de taille moyenne (Ouimet et coll., 1984 ; Dawson et coll., 1990 ; Anderson et Reiner, 1991 ; Le Moine et coll., 1991), dans l'ensemble des compartiments subcellulaires (Ouimet et coll., 1984 ; Ouimet et Greengard, 1990). On observe donc une co-localisation de PP1 et DARPP-32 au sein de ces cellules.

1. Phosphorylation de la Thréonine 34 de DARPP-32 et inhibition de PP1

La stimulation des récepteurs D1 de la DA active l'adénylate cyclase, ce qui augmente la formation d'AMPC et stimule la PKA. Cette dernière phosphoryle DARPP-32 au niveau de la Thr 34, ce qui convertit DARPP-32 en un inhibiteur de PP1 (Hemmings et coll., 1984a et b) (voir figure 24 à la page 74 du manuscrit). Les conséquences de la stimulation des récepteurs D1 sur la phosphorylation de DARPP-32 peuvent être mimées par un traitement à la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (Halpain et coll., 1990).

Le traitement de tranches de striatum par le NMDA abolit complètement les effets de la forskoline sur la phosphorylation de DARPP-32 (Halpain et coll., 1990). DARPP-32 est déphosphorylé par la calcineurine (PP2B), *in vitro*, après que cette dernière ait été activée par le complexe Ca^{2+}/CaM (King et coll., 1984). L'implication de PP2B dans la déphosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 a par ailleurs été confirmée dans des cellules intactes grâce à l'utilisation de cyclosporine A, un inhibiteur spécifique de PP2B (Nishi et coll., 1997). Les effets du Glu sur la déphosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 résultent de l'activation des récepteurs AMPA et NMDA (Halpain et coll., 1990 ; Nishi et coll., 2002). La stimulation des récepteurs NMDA induit en effet une entrée de calcium dans la cellule, ce qui permet l'activation de la PP2B (MacDermott et coll., 1986). Les récepteurs AMPA étant par contre relativement imperméables au calcium, l'activation de PP2B est, dans ce cas, due à un influx de calcium *via* les canaux calciques de type L, induit par la dépolarisation issue de la stimulation des récepteurs AMPA (Hollmann et coll., 1991).

La déphosphorylation de DARPP-32 est également observée lors d'un traitement au quinpirole, un agoniste D2. Cette déphosphorylation de DARPP-32 induite par la stimulation des récepteurs D2 de la DA implique d'une part l'inhibition de la PKA (Lindskog et coll., 1999) et d'autre part l'activation de PP2B (Nishi et coll., 1997). Ainsi, la déphosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 peut être induite soit suite à la stimulation des récepteurs ionotropes du Glu, soit suite à la stimulation des récepteurs D2 de la DA. Elle entraîne la dissociation des complexes DARPP-32/PP1 et est par conséquent associée à une augmentation de l'activité de PP1.

2. Liaison PP1/phospho-DARPP-32 (Thréonine 34)

Différentes études, utilisant notamment des peptides de synthèse englobant la région N-terminale de DARPP-32 située autour de la Thr 34, ont indiqué que 2 sous-domaines de cette région sont nécessaires à l'inhibition de PP1 (Hemmings et coll., 1990 ; Desdouits et coll., 1995a ; Kwon et coll., 1997). Phospho-DARPP-32 interagit en effet avec PP1 au niveau de deux sites distincts : un site au niveau du site catalytique de PP1, dont la liaison est phospho-DARPP-32 (Thr 34) dépendante, et un site à distance du site catalytique, dont la liaison est indépendante de l'état de phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32. C'est donc la conjonction de ces deux interactions relativement faibles, qui mène à une interaction de haute affinité entre phospho-DARPP-32 et PP1, et par conséquent à l'inhibition de PP1.

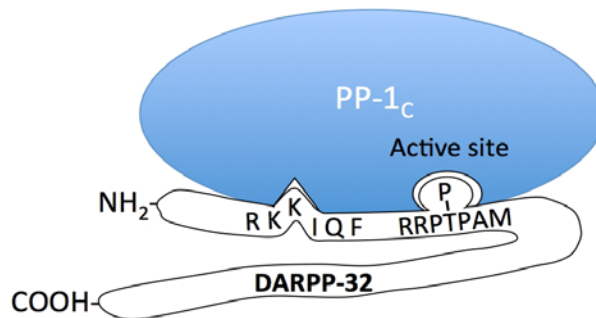


Figure 23 : **Représentation schématique de la liaison de phospho-DARPP-32 (Thr 34) à PP1** (adaptée de Greengard et coll., 1998)

Les résidus 6-11 de DARPP-32 permettent une liaison à PP1 indépendante de l'état de phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32, dans une région située à distance du site catalytique de PP1. Les résidus situés à proximité de la Thr 34 permettent, lorsqu'elle est phosphorylée, une liaison de DARPP-32 au niveau du site catalytique de PP1.

3. Régulation des interactions PP1/DARPP-32 par phosphorylation de résidus Sérine de DARPP-32

DARPP-32 peut également être phosphorylé au niveau de 3 résidus Ser (voir figure 24 à la page 74 du manuscrit) : deux sont phosphorylés par la protéine caséine kinase II (CK2), et un par la protéine caséine kinase I (CK1) (Girault et coll., 1989 ; Desdouits et coll., 1995b). CK2 phosphoryle DARPP-32 au niveau de la Ser 102, et dans une moindre mesure au niveau de la Ser 45, ce qui est associé à une augmentation de la phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 par la PKA (Girault et coll., 1989). Au contraire, CK1 phosphoryle DARPP-32 au niveau de la Ser 137 (Desdouits et coll., 1995b), induisant une diminution de la vitesse de déphosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 par PP2B (Desdouits et coll., 1995c). Cet effet n'a cependant lieu que lorsque les deux résidus sont phosphorylés au sein de la même molécule, *via* des interactions intramoléculaires. La Ser 137 est déphosphorylée par PP2C (Desdouits et coll., 1998). Il existe donc une cascade de phosphatases aboutissant à la régulation des interactions DARPP-32/PP1 : PP2C, en déphosphorylant la Ser 137 de DARPP-32, entraîne une augmentation de l'activité de PP2B, qui déphosphoryle à son tour la Thr 34 de DARPP-32, induisant la dissociation des complexes DARPP-32/PP1 et l'augmentation de l'activité de PP1.

4. Phosphorylation de la Thréonine 75 de DARPP-32 et inhibition de la PKA

DARPP-32 peut également être phosphorylé au niveau de la Thr 75 (voir figure 24), celle-ci présentant un site consensus de phosphorylation pour les proline-kinases (*'proline-directed kinases'*). DARPP-32 est notamment une cible physiologique du complexe Cdk5 (*'cyclin-dependent kinase 5'*) / p35 (Bibb et coll., 1999). Plusieurs études biochimiques ont montré que la phosphorylation de la Thr 75 de DARPP-32 par Cdk5 inhibe les phosphorylations dépendantes de la PKA dans les neurones du striatum, dont celle de la Thr 34 de DARPP-32.

La phosphorylation de la Thr 75 peut être régulée par la DA et le Glu. En effet, la stimulation des récepteurs D1 diminue la phosphorylation de la Thr 75 *via* l'activation d'une isoforme spécifique de PP2A par la PKA (Nishi et coll., 2000). Des résultats similaires peuvent être observés dans certaines conditions, suite à l'activation des récepteurs AMPA et NMDA. En effet, la stimulation des récepteurs AMPA et NMDA peut également activer une PP2A dépendante du calcium (Nishi et coll., 2002), même si ce type de stimulation reste

associé, dans la majorité des cas, à la déphosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 par PP2B.

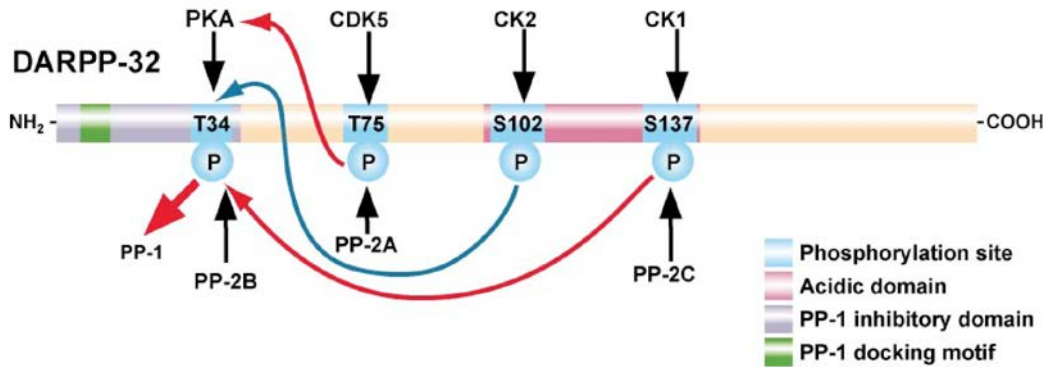
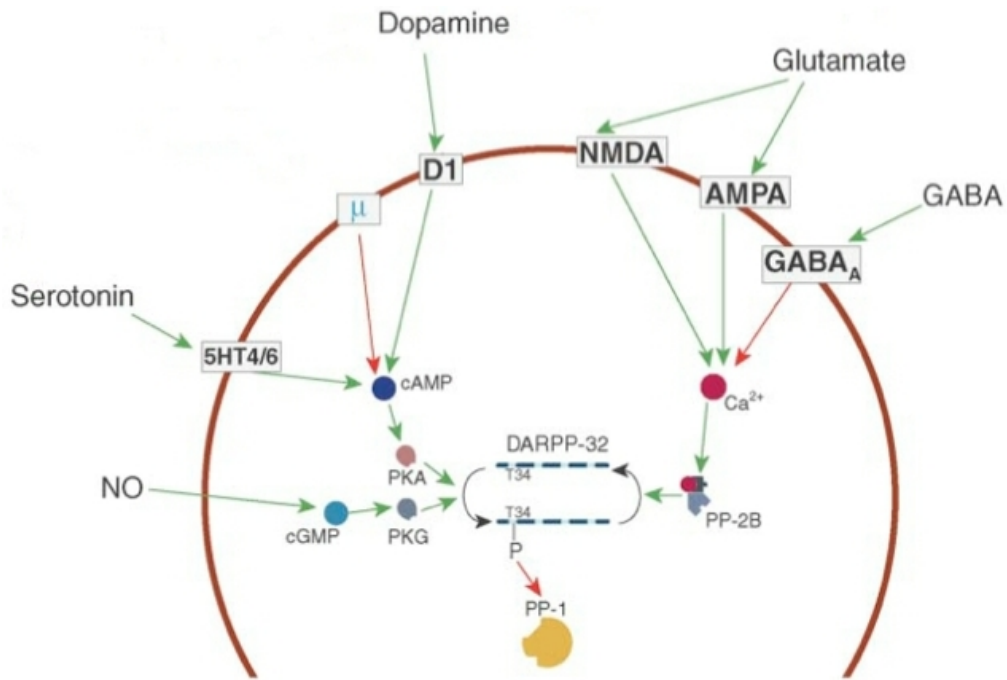


Figure 24 : Représentation schématique des sites de phosphorylation de DARPP-32 (adaptée de Svenningsson et coll., 2004)

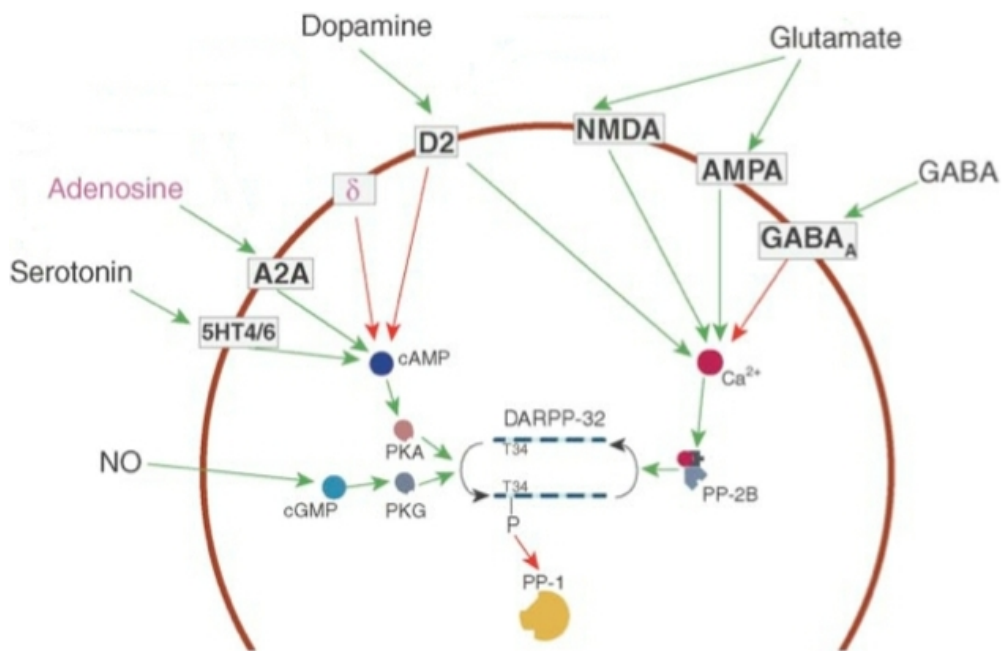
DARPP-32 est phosphorylé au niveau de la Thr 34 par la PKA, ce qui le convertit en inhibiteur de PP1. La déphosphorylation de la Thr 34 est assurée par PP2B. La phosphorylation de la Ser 102 par CK2 augmente la phosphorylation de la Thr 34 par la PKA. La phosphorylation de la Ser 137 par CK1 diminue la vitesse de déphosphorylation de la Thr 34 par PP2B ; elle est déphosphorylée par PP2C. La phosphorylation des résidus Ser 102 et Ser 137 favorise donc la phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 et l'inhibition de PP1. DARPP-32 peut également être phosphorylé au niveau de la Thr 75 par Cdk5, ce qui induit plutôt une inhibition de la PKA. La déphosphorylation de la Thr 75 est assurée par PP2A.

Les flèches rouges indiquent les effets inhibiteurs, la flèche bleue, les effets activateurs.

Ainsi, bien que DARPP-32 soit majoritairement un inhibiteur de PP1, il peut également, lorsqu'il est phosphorylé au niveau de la Thr 75, inhiber la PKA et favoriser la désinhibition de PP1. Les interactions DARPP-32/PP1 sont finement régulées par l'état de phosphorylation des différents sites de phosphorylation de DARPP-32, celui-ci étant modulé notamment par la DA et le Glu, bien que d'autres neurotransmetteurs interviennent également (voir figure 25).



Neurones striato-nigraux



Neurones striato-pallidaux

Figure 25 : **Modulation des interactions DARPP-32/PP1 par les différents systèmes de neurotransmission** (adaptée de Svenningsson et coll., 2004)

Présentation des récepteurs et des principales voies de signalisation intracellulaires mis en jeu par les systèmes de neurotransmission innervant les neurones épineux de taille moyenne du striatum (striato-nigraux et striato-pallidaux) et aboutissant à la régulation de l'état de phosphorylation de DARPP-32, et donc des interactions DARPP-32/PP1.

5. Conséquences physiologiques de l'interaction PP1/DARPP-32

La régulation des interactions DARPP-32/PP1 joue un rôle physiologique majeur dans le fonctionnement des neurones épineux de taille moyenne du striatum. PP1 déphosphoryle en effet de nombreux effecteurs physiologiques au sein de ces cellules.

PP1 est notamment impliquée dans la déphosphorylation des récepteurs NMDA et AMPA du Glu. En effet, l'activation de la PKA et l'inhibition de PP1 suite à la stimulation des récepteurs D1 de la DA induisent une augmentation de la phosphorylation de la Ser 897 de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA et de la Ser 845 de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, entraînant une augmentation des courants NMDA et AMPA (Fienberg et coll., 1998 ; Snyder et coll., 1998 ; Yan et coll., 1999 ; Flores-Hernandez et coll., 2002). Au contraire, les souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé présentent une diminution de la phosphorylation de ces sous-unités induite normalement par la DA, confirmant l'implication de PP1 (Fienberg et coll., 1998 ; Fienberg et Greengard, 2000).

La stimulation des récepteurs D1 de la DA induit également une augmentation de la phosphorylation des sous-unités $\beta 1/\beta 3$ des récepteurs GABA-A, vraisemblablement au niveau de la Ser 409, ce qui entraîne une inhibition des courants GABA-A (Flores-Hernandez et coll., 2000). Ces effets sont atténués chez les souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé, illustrant le rôle de PP1 dans la déphosphorylation des sous-unités $\beta 1/\beta 3$ des récepteurs GABA-A (Fienberg et Greengard, 2000).

Parmi les autres substrats de PP1, citons des canaux ioniques (canaux Na^+ dépendant du voltage, canaux calciques de type L, N et P) et la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$. La stimulation des récepteurs D1 active la PKA, qui phosphoryle alors les canaux Na^+ voltage-dépendant, induisant une diminution des courants Na^+ (Schiffmann et coll., 1995). Des résultats similaires sont observés suite à l'injection de phospho-DARPP-32 dans des neurones striataux. L'activation de la PKA augmente également la phosphorylation des canaux calciques de type L, et par conséquent les courants calciques de type L (Surmeier et coll., 1995). L'implication de PP1 dans la régulation des canaux calciques de type N et P et dans celle de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ a notamment été confirmée grâce à l'utilisation des souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé, celles-ci présentant une diminution de l'inhibition des canaux calciques de type N/P et de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ normalement induite par la stimulation des récepteurs D1 de la DA (Fienberg et coll., 1998).

Le complexe DARPP-32/PP1 intervient par ailleurs dans la régulation des changements à long terme de l'excitabilité neuronale. Ces changements à long terme sont associés à des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le maintien des changements d'efficacité synaptique et dans l'induction de changements morphologiques adaptatifs. La transcription de ces gènes est notamment régulée par des facteurs de transcription comme CREB (Hyman et Malenka, 2001). Il est largement établi que la DA, *via* l'activation des récepteurs D1 et de la PKA, stimule la phosphorylation de CREB au niveau de la Ser 133, entraînant une augmentation de son activité (Hyman et Malenka, 2001). La déphosphorylation de la Ser 133 est assurée par PP1 (Liu et Graybiel, 1996), ce qui est confirmé par le fait que l'activité de CREB est réduite chez les souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé (Fienberg et coll., 1998 ; Svenningsson et coll., 2000).

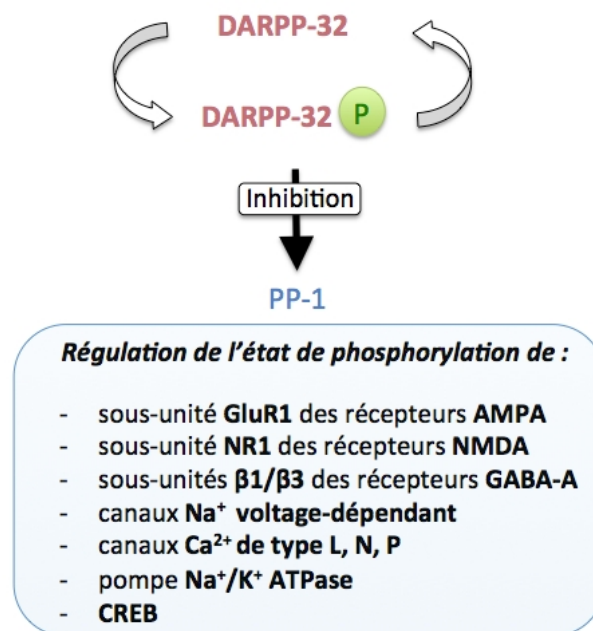


Figure 26 : **Interactions DARPP-32/PP1 et régulation de l'état de phosphorylation de nombreux effecteurs physiologiques au sein des neurones épineux de taille moyenne du striatum** (*adaptée de Greengard et coll., 1998*)

Compte tenu du fait que les interactions DARPP-32/PP1 dans le striatum sont régulées par la DA, ainsi que par les autres systèmes de neurotransmission modulés par les drogues, le complexe DARPP-32/PP1 semble idéalement positionné pour participer à la médiation et/ou à la modulation des effets à court, voire à long-terme des drogues.

B. Interactions DARPP-32/PP1 et cocaïne

1. Effets d'un traitement aigu vs chronique par la cocaïne sur la phosphorylation de la Thréonine 34 vs 75 de DARPP-32

Un traitement aigu par la cocaïne augmente la phosphorylation de la Thr 34 et de la Ser 130 de DARPP-32, mais diminue celle de la Thr 75 (Nestler, 2001 ; Svenningsson et coll., 2003 ; pour revues : Nairn et coll., 2004 ; Svenningsson et coll., 2004 et 2005), ce qui conduit à l'inhibition de PP1. On observe notamment une augmentation de la phosphorylation des sous-unités NR1 des récepteurs NMDA et des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA, corrélée à une augmentation des courants NMDA et AMPA (Fienberg et coll., 1998 ; Snyder et coll., 1998 ; Yan et coll., 1999 ; Flores-Hernandez et coll., 2002). On note également une augmentation de la phosphorylation des sous-unités $\beta 1/\beta 3$ des récepteurs GABA-A, induisant au contraire une diminution des courants GABA-A (Flores-Hernandez et coll., 2000). Le traitement par la cocaïne favorise ainsi l'excitabilité neuronale. Puisque la cocaïne, *via* la phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 et l'inhibition de PP1, induit par ailleurs la phosphorylation de CREB et l'activation de la transcription de *c-fos* ou encore *fras* (Hyman et Malenka, 2001 ; Nestler, 2001), elle pourrait par ce mécanisme favoriser l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques impliqués dans les processus de plasticité synaptique et structurale.

Il est intéressant de noter qu'un traitement chronique par la cocaïne augmente l'expression de Cdk5 et de p35 dans le striatum, favorisant la phosphorylation de la Thr 75 de DARPP-32 au détriment de celle de la Thr 34 (Bibb et coll., 2001). Or, l'injection d'inhibiteurs de Cdk5 dans le noyau NAc potentialise la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (Bibb et coll., 2001), ce qui suggère que l'induction par la cocaïne de Cdk5 et p35 constituerait un mécanisme de rétrocontrôle négatif, mis en jeu afin de limiter les effets de la cocaïne. Le traitement chronique par la cocaïne entraîne également une augmentation soutenue de l'expression de Δ FosB, impliquée dans le développement de la dépendance (Hyman et Malenka, 2001 ; Nestler, 2001). De manière intéressante, Δ FosB intervient par ailleurs dans la régulation de la transcription de Cdk5 (Bibb et coll., 2001).

2. Apports des souris dont le gène DARPP-32 a été invalidé

Différentes études réalisées sur ces souris ont cherché à préciser le rôle du complexe DARPP-32/PP1 dans les comportements liés à la drogue. On observe en effet chez ces

animaux, en plus des altérations biochimiques, plusieurs altérations comportementales (Fienberg et coll., 1998 ; Hiroi et coll., 1999 ; Zachariou et coll., 2002).

On note une diminution de l'hyperlocomotion induite par un traitement aigu par la cocaïne (Fienberg et coll., 1998), mais par contre une sensibilisation comportementale accrue en réponse à des injections répétées de cocaïne (Hiroi et coll., 1999). Cette implication différentielle de DARPP-32 pourrait être liée à la phosphorylation différentielle des Thr 34 et 75 de DARPP-32 observée suite à un traitement aigu *vs* chronique, ainsi qu'aux relations antagonistes existant entre ces deux sites (Nishi et coll., 2000 ; Bibb et coll., 2001). DARPP-32, *via* la phosphorylation de la Thr 34, favoriserait l'hyperlocomotion induite par une injection unique de cocaïne, mais, dans le cas d'injections répétées, limiterait le développement de la sensibilisation comportementale, *via* la phosphorylation de la Thr 75.

On observe par ailleurs chez ces souris une diminution de la préférence de place pour la cocaïne (Zachariou et coll., 2002), celle-ci n'étant liée ni à une altération de la libération ou de la recapture de la DA (Zachariou et coll., 2002), ni à un déficit d'apprentissage spatial. Ces animaux présentent en effet des performances normales dans des tests d'apprentissage spatial et associatif (Heyser et coll., 2000), même si des déficits de '*reversal learning*' sont tout de même observés dans une tâche de conditionnement opérant discriminatif (Heyser et coll., 2000). La régulation des interactions DARPP-32/PP1 est donc fortement impliquée dans les propriétés renforçantes de la cocaïne.

3. Rôle spécifique de la phosphorylation de chacun des résidus Thréonine 34 et 75 de DARPP-32 dans les effets de la cocaïne

Au vu des anomalies comportementales, mais également biochimiques observées en réponse à la cocaïne chez les souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé, certaines études ont cherché à évaluer le rôle spécifique de la phosphorylation de chacun des résidus Thr 34 et Thr 75 de DARPP-32 dans les comportements liés à la drogue.

Les résultats les plus clairs ont été obtenus chez les souris présentant une mutation empêchant la phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32. Celles-ci présentent en effet le même phénotype comportemental que les souris dont le gène *DARPP-32* a été invalidé (Zachariou et coll., 2006 ; Zhang et coll., 2006). La phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 et l'inhibition de PP1 apparaissent donc nécessaires aux effets comportementaux induits par un traitement aigu par la cocaïne, et à la régulation des facteurs de transcription et de

gènes précoces impliqués dans les processus de plasticité synaptique et structurale. Elles régulent également les propriétés renforçantes de la cocaïne. Les souris mutées au niveau de la Thr 34 de DARPP-32 présentant par ailleurs une augmentation de la sensibilisation comportementale, tout comme les souris dont le gène DARPP-32 a été invalidé (Fienberg et coll., 1998 ; Hiroi et coll., 1999 ; Zachariou et coll., 2006), la phosphorylation de la Thr 34 de DARPP-32 et l'inhibition de PP1 pourraient donc également jouer un rôle de rétrocontrôle négatif lors d'administrations répétées de cocaïne.

Les résultats obtenus suite à la mutation de la Thr 75 de DARPP-32 sont au contraire plutôt étonnants. En effet, les effets renforçants de la cocaïne ne sont pas affectés par cette mutation, ni en préférence de place, ni en AA (Zachariou et coll., 2006 ; Zhang et coll., 2006), ce qui pourrait être expliqué, dans le cas de l'AA, par le fait que l'AA de cocaïne ne modifie pas les taux de Cdk5 dans le NAc (Lu et coll., 2003). On n'observe pas non plus de sensibilisation locomotrice chez ces animaux (Zachariou et coll., 2006), ce qui est surprenant puisque l'inhibition de la phosphorylation de la Thr 75 de DARPP-32 suite à l'injection locale d'inhibiteurs de Cdk5 dans le NAc induit, elle, une augmentation de la sensibilisation locomotrice (Bibb et coll., 1999). Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de préciser le rôle de la phosphorylation de la Thr 75, mais aussi de la Thr 34 de DARPP-32, dans les effets observés en réponse à un traitement chronique par la cocaïne.

V. PP1 et mémoire

Comme nous l'avons vu précédemment, PP1 est fortement impliquée dans la plasticité synaptique, notamment au niveau de l'hippocampe. Ces mécanismes étant considérés comme les bases moléculaires et cellulaires de l'apprentissage et la mémoire, certaines études ont cherché à évaluer le rôle de PP1 dans ces processus.

L'inhibition génétique de PP1 dans le cortex et l'hippocampe durant la phase d'apprentissage améliore les performances des animaux dans une tâche de reconnaissance d'objets. Ceci est corrélé à une augmentation de la phosphorylation de la CaMKII, de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA et de CREB, et par conséquent, à l'induction de l'expression des gènes contrôlés par CREB (Genoux et coll., 2002). Lorsque l'inhibition de PP1 est induite après l'apprentissage, on observe un maintien plus long des souvenirs, indiquant que PP1 favorise également l'oubli. Ces données ont conduit à considérer PP1

comme un supprimeur d'apprentissage et de mémoire. Ceci est par ailleurs conforté par les résultats de Miller et Sweatt, qui ont noté une inhibition de la transcription de PP1 suite à un conditionnement de peur au contexte, alors que l'expression de la *reelin*, un gène 'promnésiant', est au contraire induite (Miller et Sweatt, 2007). Une amélioration des processus mnésiques est également observée lorsque seule la fraction nucléaire de PP1 est inhibée (Koshibu et coll., 2009 et 2011 ; Gräff et coll., 2010). Cette amélioration des capacités mnésiques est associée à une augmentation de la LTP, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de CREB et d'autres gènes impliqués dans les processus de plasticité et de mémoire et, à l'opposé, à la répression des gènes régulant négativement ces processus (Koshibu et coll., 2009 et 2011 ; Gräff et coll., 2010). La fraction nucléaire de PP1 intervient donc également dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire, en régulant la transcription de gènes impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique et de mémoire. Le rôle de supprimeur d'apprentissage et de mémoire de PP1 pourrait constituer un mécanisme moléculaire mis en jeu pour 'effacer' les souvenirs erronés ou inutiles, et éviter ainsi la saturation de la capacité de stockage des réseaux neuronaux et l'accumulation d'activité neuronale superflue.

Cependant, certaines études montrent que l'inhibition de PP1 par injection d'inhibiteurs pharmacologiques est au contraire associée à l'apparition de déficits mnésiques. L'injection d'acide okadaïque induit en effet des déficits de rétention des souvenirs chez le poulet (Bennett et coll., 2001 et 2003). De même, l'injection de calyculine A est corrélée à des altérations de la mémoire spatiale évaluée en piscine de Morris chez le Rat (Sun et coll., 2003). Ces troubles de la mémoire pourraient notamment s'expliquer par l'hyperphosphorylation de tau observée suite à l'inhibition de PP1 (Sun et coll., 2003). L'hyperphosphorylation de tau étant l'une des caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, PP1 pourrait de ce fait être impliquée dans les déficits cognitifs observés lors de la maladie d'Alzheimer. Bien que contradictoires, ces données confirment néanmoins l'implication de PP1 dans les processus d'apprentissage et de mémoire.

Il est largement établi que la consommation répétée de drogues induit chez le consommateur régulier la mise en place d'habitudes liées à la drogue. Celles-ci sont considérées comme un type de mémoire procédurale et impliquent donc le striatum dorsal. Même si les mécanismes moléculaires sous-tendant la mémoire procédurale sont moins bien connus que ceux sous-tendant la mémoire dépendant de l'hippocampe, il semblerait que la

mémoire procédurale nécessite la mise en jeu de processus de LTP striatale au niveau des synapses cortico-striatales. Cette LTP dépendrait de l'activation des récepteurs D1 de la DA (Calabresi et coll., 2000; Kerr et Wickens, 2001), de la voie de la PKA (Centonze et coll., 2003) et de la régulation de la transcription par CREB (Pittenger et coll., 2006). L'inhibition de PP1 par la cocaïne pourrait ainsi favoriser le développement et le maintien des habitudes liées à la drogue.

De par son expression au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal, deux régions cérébrales connues pour leur rôle dans la formation et le stockage des souvenirs déclaratifs (Nadel et Moscovitch, 1997 ; Frankland et coll., 2001 ; Squire et coll., 2001 ; Frankland et Bontempi, 2005), PP1 pourrait également participer à la modulation des souvenirs déclaratifs liés à la drogue. L'inhibition de PP1 par la cocaïne pourrait notamment potentialiser la mémorisation du contexte lié à la drogue.

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, la prise chronique de drogue induit des phénomènes de plasticité notamment au niveau du striatum. Ces processus nécessitent l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques, contrôlés entre autres par des facteurs de transcription comme CREB. Il existe cependant un autre niveau de régulation de l'expression des gènes, l'épigénétique. Dans le chapitre suivant, nous développerons les différents types de modifications épigénétiques et nous verrons que la cocaïne altère l'expression de certains gènes, *via* la mise en jeu de ces mécanismes.

CHAPITRE 3

COCAÏNE, MODIFICATIONS EPIGENETIQUES ET PP1

CHAPITRE 3

COCAÏNE, MODIFICATIONS EPIGENETIQUES ET PP1

Le terme d'épigénétique apparut pour la première fois en 1942, énoncé par Conrad Waddington, et définissait l'ensemble des mécanismes permettant à un seul génotype de générer différents phénotypes : *'Epigenetics... the branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products which bring the phenotype into being'* (Waddington, 1942). Waddington imaginait le développement d'un organisme comme la conséquence d'un dialogue entre l'information génétique et l'environnement. Il soulignait ainsi l'incapacité de la génétique à expliquer à elle seule le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

Par la suite, des travaux pionniers ont montré que des processus comme la méthylation de l'ADN et les modifications biochimiques des histones pouvaient influencer l'expression des gènes, à la fois dans le temps et dans l'espace. Parmi les papiers princeps, on peut notamment citer les revues de Holliday et Pugh (1975) et de Riggs (1975) sur les ADN méthylases de bactérie, dans lesquelles ils proposèrent non seulement que la méthylation de l'ADN intervenait dans la régulation des gènes au cours du développement, *via* un contrôle des interactions entre séquences régulatrices et machinerie transcriptionnelle, mais également que le profil de méthylation des cytosines pouvait être hérité au cours des divisions cellulaires. Depuis, de nombreux travaux ont permis de vérifier les hypothèses avancées par Holliday et Pugh et par Riggs en 1975, et de mieux comprendre la notion d'épigénétique, celle-ci étant définie comme l'ensemble des mécanismes contrôlant l'expression des gènes en affectant la structure de la chromatine (Wolffe et Matzke, 1999). Ces modifications sont réversibles, soumises aux contraintes environnementales. Elles sont nécessaires au développement et au fonctionnement normal d'un organisme, une altération de ces processus étant corrélée à diverses pathologies, comme certaines formes de retard mental ou de cancers.

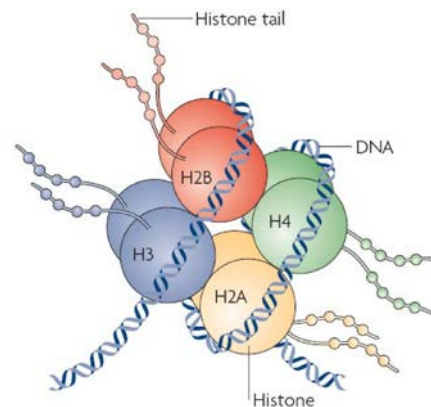
I. Chromatine et compaction de l'ADN

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique, contenu dans le noyau, s'organise en une structure complexe constituée d'ADN et de protéines : la chromatine (Flemming, 1878). Deux mètres d'ADN environ sont contenus dans chaque cellule, dans un noyau de seulement quelques micromètres de diamètre, ce qui témoigne d'un important degré de compaction de l'ADN.

L'unité fondamentale de la chromatine, le nucléosome, permet d'obtenir le premier degré de compaction. Le nucléosome est constitué de l'enroulement de 146 paires de bases du double brin d'ADN autour d'un octamère d'histones (2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4). Une cinquième histone, l'histone H1, est incorporée au niveau de la région internucléosomale et permet ainsi le pontage entre deux nucléosomes adjacents.

Figure 27 : **Représentation schématique du nucléosome** (adaptée de Tsankova et coll., 2007)

Le nucléosome est constitué de l'enroulement du double brin d'ADN sur une longueur de 146 paires de bases, autour d'un octamère d'histones regroupant deux histones H2A, deux histones H2B, deux histones H3 et deux histones H4. Les histones sont constituées d'un noyau globulaire duquel émerge l'extrémité N-terminale (ou queue de l'histone, 'histone tail').



Les histones sont de petites protéines basiques (11 à 22 kDa), extrêmement bien conservées au cours de l'évolution, constituées d'un noyau globulaire duquel émerge l'extrémité N-terminale. Elles contiennent plus de 20% de résidus dont la charge globale est positive (résidus Arginine ou Lysine), ce qui leur permet d'interagir avec le squelette phosphodiester de l'ADN chargé négativement.

La formation de nucléosomes permet une compaction de l'ADN de l'ordre de 5 à 10 fois, aboutissant à une fibre en « collier de perles » de 11 nm de diamètre. Le pontage entre deux nucléosomes adjacents, réalisé par l'histone H1, permet ensuite un enroulement des nucléosomes sur eux-mêmes selon une hélice régulière comprenant 6 nucléosomes par tour. On obtient alors une fibre solénoïdale de 30 nm de diamètre (McGhee et Felsenfeld, 1980).

La compaction de l'ADN se poursuit par la formation de boucles, donnant lieu à une fibre de 300 nm de diamètre. Cette dernière constitue la forme peu condensée du chromosome, l'euchromatine. Les boucles peuvent également se replier sur elles-mêmes et augmenter ainsi le niveau de compaction de l'ADN jusqu'à l'obtention d'une fibre de 700 nm de diamètre, correspondant à la forme très condensée du chromosome, l'hétérochromatine.

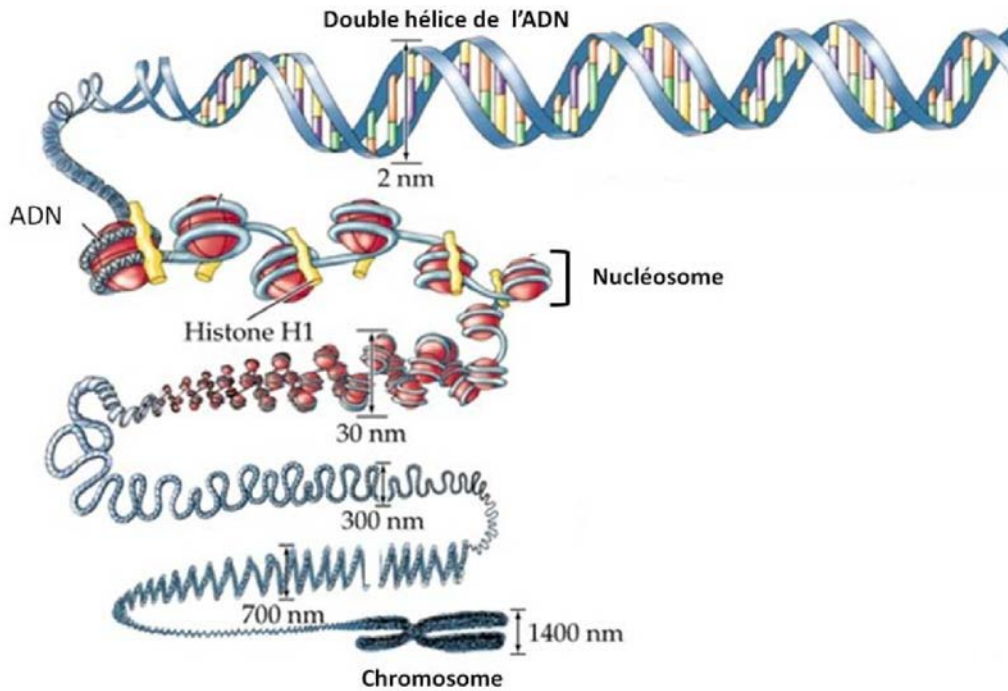


Figure 28 : Représentation schématique des différents stades de compaction de l'ADN

Le degré de compaction de la chromatine définit l'accès de la machinerie transcriptionnelle à la séquence nucléotidique, et par conséquent, le degré d'expression des gènes. En effet, lorsque la chromatine est fortement condensée (hétérochromatine), la machinerie transcriptionnelle ne peut accéder à la séquence d'ADN. La transcription des gènes est donc réprimée. *A contrario*, une conformation relâchée de la chromatine (euchromatine) favorise l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, ce qui permet la transcription des gènes. Il existe en fait différents niveaux de compaction intermédiaires entre ces deux états extrêmes (hétérochromatine vs euchromatine) et il est possible de basculer d'un niveau de compaction à un autre, grâce aux modifications épigénétiques. Celles-ci permettent

de remodeler de petites portions de chromatine, et donc d'en modifier le degré de compaction, permettant ainsi une régulation, à la fois spatiale et temporelle, de l'expression des gènes (pour revue : Tsankova et coll., 2007).

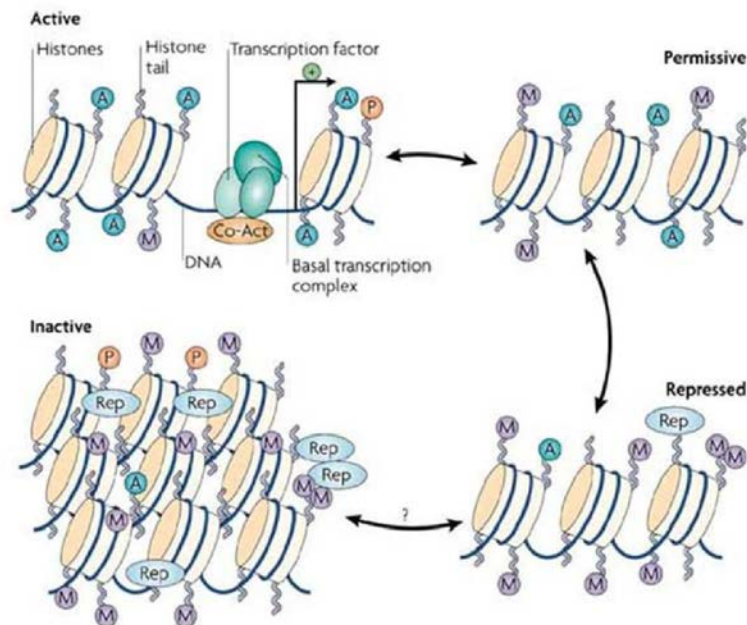


Figure 29 : **Passage d'un état de compaction à un autre via des mécanismes épigénétiques** (tirée de Tsankova et coll., 2007)

Certaines modifications épigénétiques comme l'acétylation ou la phosphorylation des histones favorisent le relâchement de la chromatine et l'accès de la machinerie transcriptionnelle (facteurs de transcription, co-activateurs transcriptionnels et complexe basal de la transcription) à l'ADN, induisant une transcription des gènes. La méthylation des histones et la méthylation de l'ADN induisent au contraire une compaction de l'ADN, interdisant l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. Cette conformation est donc associée à une répression de la transcription. Les modifications épigénétiques permettent ainsi de basculer d'une conformation active d'un point de vue transcriptionnel, à un état permissif, puis à un état réprimé et, dans le cas où la condensation de la chromatine est maximale, à un état inactif.

II. Modifications épigénétiques

Différents types de modifications permettent le passage d'un état de compaction de la chromatine à un autre. L'ensemble de ces mécanismes est énoncé dans la figure 30, les plus connus étant la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Dans ce paragraphe, nous développerons plus amplement la méthylation de l'ADN, modification épigénétique à laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressée au cours de ce travail de thèse.

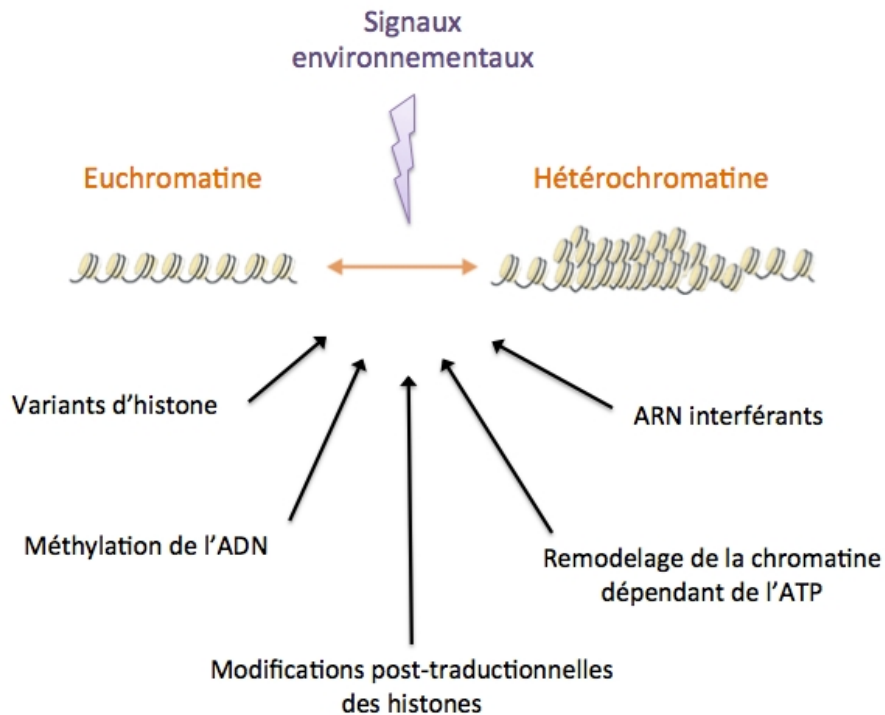


Figure 30 : **Mécanismes épigénétiques impliqués dans le remodelage de la chromatine** (adaptée de Trojer et Reinberg, 2007)

La transition entre euchromatine et hétérochromatine est régulée par divers signaux environnementaux. Ce remodelage de la chromatine implique la mise en jeu de différents mécanismes : l'échange entre différents variants d'histones, la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine sous l'effet d'enzymes dépendant de l'ATP ou encore les ARN interférants.

A. Méthylation de l'ADN

1. Généralités

La méthylation de l'ADN est observée chez la plupart des organismes vivants, de la bactérie aux mammifères (Bird, 2002). Elle a lieu au niveau de résidus adénosine et cytosine chez les procaryotes, uniquement au niveau de cytosine chez les eucaryotes, et exclusivement au niveau d'une cytosine suivie d'une guanine (dinucléotides CpG) chez les vertébrés. Les CpG sont répartis dans l'ensemble du génome, de manière non uniforme. On note en effet la présence de régions riches en CpG, appelées îlots CpG. Un îlot est classiquement défini par une longueur d'au moins 200 paires de bases, contenant au moins 50% de CG et présentant un rapport « CpG observés / CpG attendus » supérieur à 0,6 (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). Le génome humain contient approximativement 25000 îlots, ce qui représente moins de 2% du génome (Bird, 2002 ; Pennings et coll., 2005). La majorité des îlots est située dans

la région 5' des gènes, au niveau du promoteur, du premier exon ou du premier intron (Klose et Bird, 2006). Il est intéressant de noter que 6 à 8% des îlots sont méthylés de manière tissu-spécifique (Illingworth et coll., 2008), suggérant que le profil dynamique de méthylation de l'ADN est impliqué dans le processus de différenciation tissulaire (Suzuki et Bird, 2008).

La méthylation de l'ADN s'effectue sur les deux brins de l'ADN. Il s'agit d'une liaison covalente, qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) en position 5' d'une cytosine, formant ainsi une 5-méthylcytosine. La S-adenosyl-L-méthionine est utilisée comme donneur de méthyle (Smith et coll., 1992). La réaction de méthylation de l'ADN est catalysée par des ADN méthyltransférases ou DNMT ('DNA methyltransferase'). Ces enzymes sont notamment constituées d'un grand domaine régulateur N-terminal, permettant leur localisation nucléaire, et d'un domaine catalytique en C-terminal (Cheng et Blumenthal, 2008). On distingue trois types de DNMT : les DNMT1, 2 et 3. La DNMT1, du fait de sa préférence pour l'ADN hémi-méthylé, est considérée comme une DNMT de maintenance. Elle est en grande partie impliquée dans le maintien des profils de méthylation au cours de la réplication de l'ADN (Li, 2002). La DNMT2 a été identifiée par homologie de séquence à la DNMT1. Elle présente une faible activité enzymatique et son rôle exact n'est pour l'instant pas connu. Enfin, la DNMT3 présente deux isoformes majoritaires, les DNMT3A et 3B. Contrairement à la DNMT1, les DNMT3A et 3B sont en charge de la méthylation *de novo*.

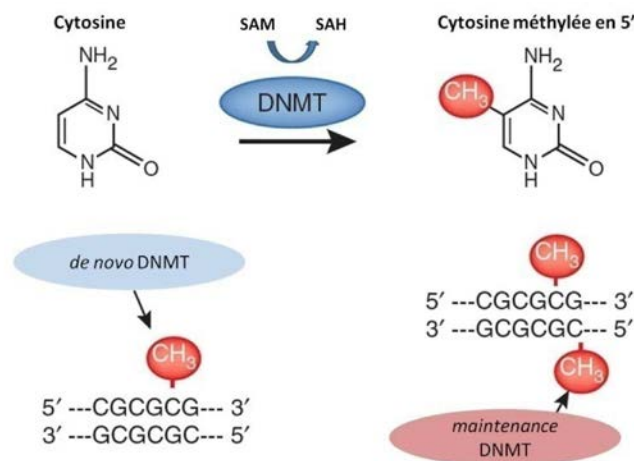


Figure 31 : Réaction de méthylation de l'ADN (adaptée de Day et Sweatt, 2010)

Les DNMT catalysent la réaction de méthylation de l'ADN, qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) en position 5' d'une cytosine, formant ainsi une 5-méthylcytosine. La S-adenosyl-L-méthionine (SAM) est utilisée comme donneur de méthyle. Il existe des DNMT de maintenance (DNMT1), impliquées dans le maintien des profils de méthylation au cours de la réplication de l'ADN. Il existe également des DNMT en charge de la méthylation *de novo* (DNMT3A et 3B).

La méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG situés dans les régions 5' régulatrices des gènes est associée à une répression transcriptionnelle (Robertson et Wolffe, 2000). La transformation de la cytosine en 5-méthylcytosine empêche en effet la fixation des facteurs de transcription au niveau de ces régions promotrices (Watt et Molloy, 1988). Elle permet par ailleurs la liaison à l'ADN méthylé de protéines MBD ('*Methyl Binding Domain proteins*') (Boyes et Bird, 1991 ; Hendrich et Bird, 1998), ce qui induit le recrutement d'importants complexes protéiques impliqués dans la compaction de la chromatine (Lopez-Serra et Esteller, 2008).

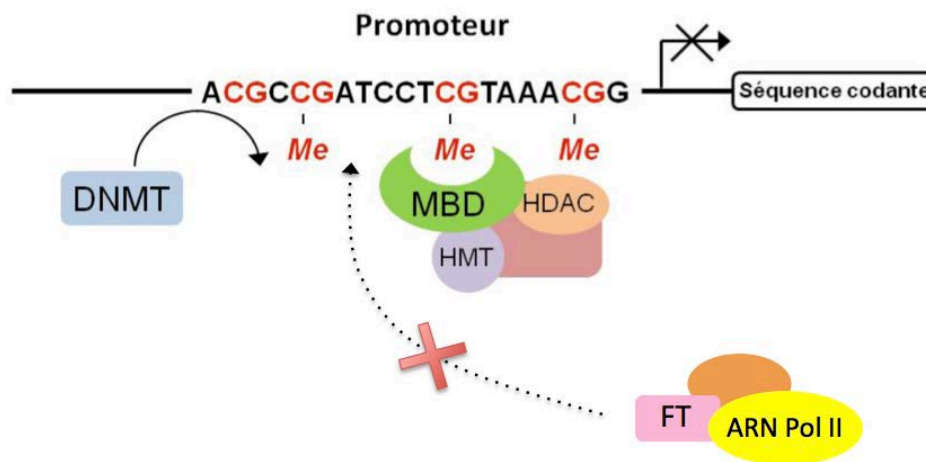


Figure 32 : **Illustration schématique de la répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN est assurée par les DNMT. La transformation de la cytosine en méthylcytosine au sein du promoteur empêche la fixation des facteurs de transcription (FT) au niveau de cette même région. Elle induit par contre la liaison de protéines de liaison à l'ADN méthylé (MBD). Les MBD permettent le recrutement d'importants complexes protéiques impliqués dans la compaction de l'ADN, constitués notamment d'histones déacétylases (HDAC) et d'histones méthyltransférases (HMT). La compaction de la chromatine qui en résulte interdit l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (ARN Polymérase II), d'où une répression de la transcription.

2. Présentation d'une protéine de liaison à l'ADN méthylé : MeCP2

2.1. Généralités

La protéine MeCP2 ('*Methyl-CpG binding protein 2*') est une protéine basique nucléaire, initialement identifiée du fait de sa capacité à se lier spécifiquement à l'ADN méthylé au niveau des cytosines de dinucléotides CpG (Lewis et coll., 1992). La protéine MeCP2 est exclusivement présente chez les mammifères. Elle est le chef de file d'une famille comprenant quatre autres membres (MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4).

Le gène *MeCP2* est constitué de quatre exons. Deux sites d'épissage alternatif permettent de générer deux variants : *MeCP2-e1* (ou *MeCP2α*) et *MeCP2-e2* (ou *MeCP2β*). Le variant *MeCP2-e1* est la forme prédominante. Il contient les exons 1, 3 et 4 (Kriaucionis et Bird, 2004 ; Mnatzakanian et coll., 2004). Le variant *MeCP2-e2* est quant à lui constitué des quatre exons (Reichwald et coll., 2000). Le gène *MeCP2* possède une longue région 3' UTR ('*Untranslated Region*', région transcrite, mais non traduite), qui contient 4 sites de polyadénylation. La présence des deux sites d'épissage alternatif, ainsi que des 4 sites de polyadénylation permet de générer au total 8 transcrits, dont le niveau d'expression varie au cours du développement et des tissus considérés, le transcrit 10,7 kb étant la forme prédominante dans le cerveau (Coy et coll., 1999 ; Reichwald et coll., 2000 ; Kerr et coll., 2008). Des mutations de la région 3' UTR sont associées à une diminution des taux de MeCP2 (Nagarajan et coll., 2006 ; Coutinho et coll., 2007), ce qui suggère l'implication de cette région dans la stabilité des transcrits *MeCP2* et de leur traduction (Kerr et coll., 2008).

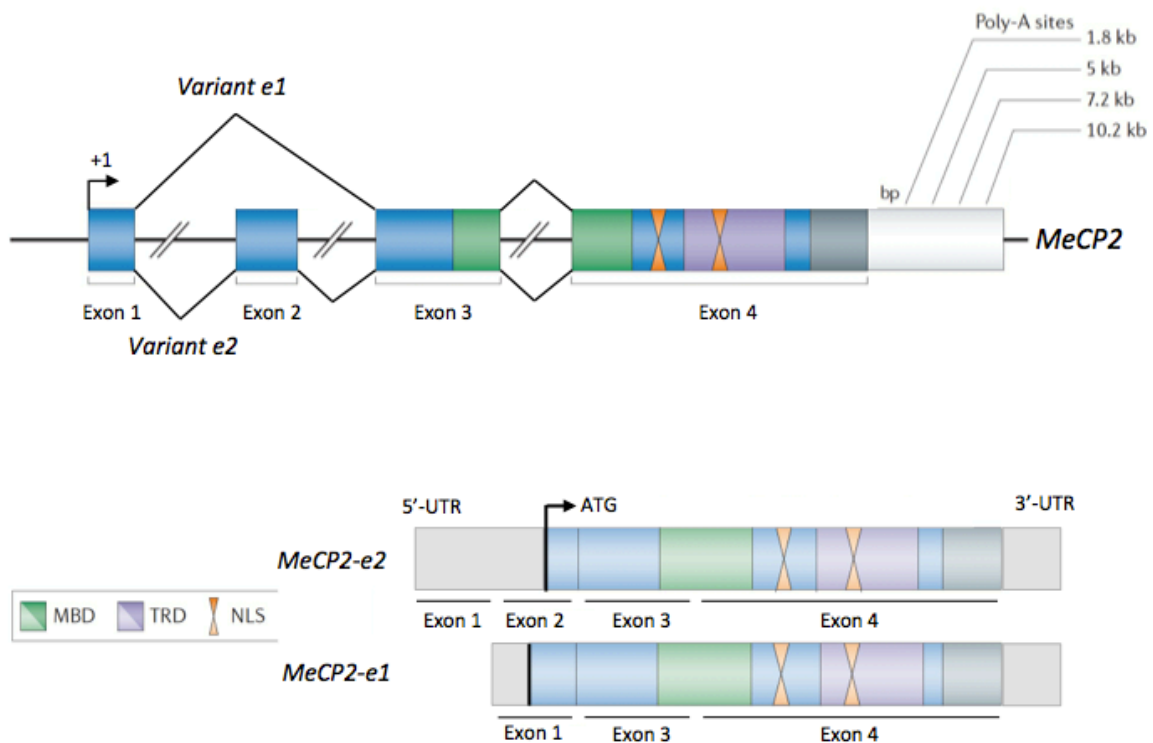


Figure 33 : Structure du gène *MeCP2* et de ses deux transcrits (tirée de Bienvenu et Chelly, 2006)

Le gène *MeCP2* est représenté avec ses quatre exons, ses deux sites d'épissage alternatif permettant de générer les transcrits *e1* (ou *MeCP2α*) et *e2* (ou *MeCP2β*), et ses quatre sites de polyadénylation en 3'-UTR. Les exons 1 et 2 contiennent chacun un site d'initiation de la traduction (ATG).

Les variants *MeCP2-e1* et *MeCP2-e2* ne diffèrent que dans leur région 5'. Chacun de ces deux transcrits code une protéine contenant un domaine de liaison à l'ADN méthylé (MBD), un domaine de répression transcriptionnelle (TRD) et des signaux de localisation nucléaire (NLS).

Comme l'ensemble des protéines MBD, la protéine MeCP2 contient un domaine de liaison à l'ADN méthylé (MBD). Celui-ci est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec les 5-méthylcytosines de l'ADN (Fatemi et Wade, 2006). Seize des 70 résidus sont strictement conservés entre les différentes protéines MBD, à l'exception de MBD3 dans laquelle 4 de ces résidus sont absents. Il est intéressant de noter que MBD3 est la seule MBD à ne pas se lier à l'ADN méthylé, ce qui suggère donc un rôle particulier de ces 4 acides aminés dans la liaison aux 5-méthylcytosines (Fatemi et Wade, 2006). En plus du domaine MBD, MeCP2 contient un domaine de répression transcriptionnelle (TRD, '*Transcriptional Repressor Domain*'), permettant le recrutement de cofacteurs répresseurs (Nan et coll., 1998). Ce domaine contient également des sites d'interaction avec des histones (Kumar et coll., 2008) ou des facteurs d'épissage alternatif (Young et coll., 2005). Enfin, deux signaux de localisation nucléaire (NLS, '*Nuclear Localisation Signal*') ont été caractérisés et permettent l'adressage de la protéine MeCP2 dans le noyau (Fatemi et Wade, 2006 ; Nikitina et coll., 2007a).

On dénombre de nombreuses mutations du gène *MeCP2*. Ces mutations sont majoritairement associées à un trouble neurodéveloppemental appelé syndrome de Rett. 95% des patients atteints par ce syndrome présentent en effet des mutations du gène *MeCP2* (Amir et coll., 1999 ; Neul et coll., 2008).

Le syndrome de Rett est un trouble neurodéveloppemental sévère non dégénératif, caractérisé par un développement postnatal normal jusqu'à l'âge de 6 mois. Les symptômes apparaissent alors progressivement (Hagberg et Skjeldal, 1994). On note tout d'abord, entre 6 et 18 mois, une stagnation du développement avec un retard des acquisitions psychomotrices, un ralentissement de la croissance du crâne, la survenue d'épisodes épileptiques, ainsi que des irrégularités respiratoires. Entre 1 et 4 ans, on observe une régression neurologique rapide, associée à une perte du langage et des mouvements coordonnés des mains, un retrait social et une apparition de stéréotypies manuelles. Cette phase de régression est suivie d'un stade de stabilisation apparente entre 2 et 10 ans, durant lequel on peut notamment remarquer une amélioration des capacités de communication et l'apparition d'un contact visuel. A partir de l'âge de 10 ans, une détérioration motrice tardive est observée, caractérisée par une perte de la marche, un trouble du tonus, une ataxie du tronc et une scoliose. La socialisation et le contact visuel sont par contre conservés tout au long de la vie adulte.

Le syndrome de Rett touche essentiellement les individus de sexe féminin avec une fréquence de 1:15000 en Europe (Bienvenu et coll., 2006). La sévérité du phénotype Rett est directement liée au degré d'inactivation aléatoire du chromosome X, en accord avec la localisation du gène *MeCP2* sur ce chromosome en Xq28 (Takagi, 2001). Les individus de sexe masculin peuvent également être atteints, même si l'incidence reste faible. Ils présentent un phénotype Rett beaucoup plus sévère (Kankirawatana et coll., 2006).

2.2. Régulation de l'expression du gène *MeCP2*

MeCP2 est différenciellement exprimé en fonction du stade de développement. On note par exemple dans l'encéphale de faibles taux de *MeCP2* au cours du développement embryonnaire, son expression augmentant après la naissance jusqu'à atteindre un plateau, maintenu ensuite tout au long de la vie de l'individu (Shahbazian et coll., 2002a et b ; Balmer et coll., 2003 ; Cassel et coll., 2004). Ce profil temporel d'expression de *MeCP2* explique vraisemblablement pourquoi les patients atteints du syndrome de Rett présentent un développement précoce normal jusqu'à l'âge de 6 mois environ. On note par ailleurs une expression différentielle de *MeCP2* en fonction des régions cérébrales. En effet, même une fois le plateau atteint, les niveaux de *MeCP2* ne sont pas équivalents d'une région cérébrale à l'autre. *MeCP2* est par exemple beaucoup plus fortement exprimé dans le cervelet, le bulbe olfactif et le cortex préfrontal que dans le striatum, l'hippocampe et le septum (Cassel et coll., 2004 ; Rusconi et coll., 2008).

On dénombre pas moins de 27 éléments activateurs et répresseurs répartis sur plus de 210 kb autour du gène *MeCP2* permettant la régulation spatio-temporelle de sa transcription et sa maturation post-traductionnelle (Liu et Francke, 2006). Le facteur de transcription SP1 (*'Specific protein 1'*) est par exemple impliqué dans l'augmentation de l'expression de *MeCP2* observée au cours des derniers stades embryonnaires (Marin et coll., 1997), alors qu'une fois la maturation des neurones achevée, d'autres facteurs comme *Egr2* (*'Early Growth Response 2'*) prennent le relais (Swanberg et coll., 2009). La présence de séquences de reconnaissance d'ARN interférents dans la région 3' UTR du gène *MeCP2* permet également de réguler l'expression de *MeCP2* (Kerr et coll., 2008), *via* la liaison d'ARN interférents comme miR-132 (*'microRNA-132'*) (Klein et coll., 2007). De manière intéressante, l'expression de miR-132 est sous le contrôle du BDNF (Klein et coll., 2007), lui-même régulé par *MeCP2*, tout comme *Egr-2*, ce qui suggère l'existence de boucles de régulation (Klein et coll., 2007 ; Swanberg et coll., 2009).

2.3. Régulation de la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé

La liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé peut également être régulée. Celle-ci dépend en effet de l'état de phosphorylation de deux résidus Ser : la Ser 80 du domaine MBD et la Ser 421 de la région C-terminale (Zhou et coll., 2006 ; Tao et coll., 2009). La phosphorylation de la Ser 80 augmente la liaison de MeCP2 au niveau de certains promoteurs, favorisant la répression de la transcription de ces gènes (Tao et coll., 2009). On constate en effet une diminution de la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé, suite à une mutation ponctuelle de ce site (Tao et coll., 2009). La phosphorylation de la Ser 421 par la CaMKII est, au contraire, associée au détachement de MeCP2 de la chromatine et donc à la non-répression de la transcription (Zhou et coll., 2006). Les mutations de ce site sont notamment corrélées à une perte de la capacité de MeCP2 à réguler divers processus comme la croissance dendritique, la maturation des épines dendritiques, ou encore la transcription du gène du *Bdnf* (Zhou et coll., 2006). Il est intéressant de préciser que dans des neurones en culture, on observe, suite à une dépolarisation membranaire, une diminution de la phosphorylation de la Ser 80 et une augmentation de la celle de la Ser 421, ce qui provoque un détachement global de MeCP2 de l'ADN méthylé et donc une importante activation transcriptionnelle (Tao et coll., 2009).

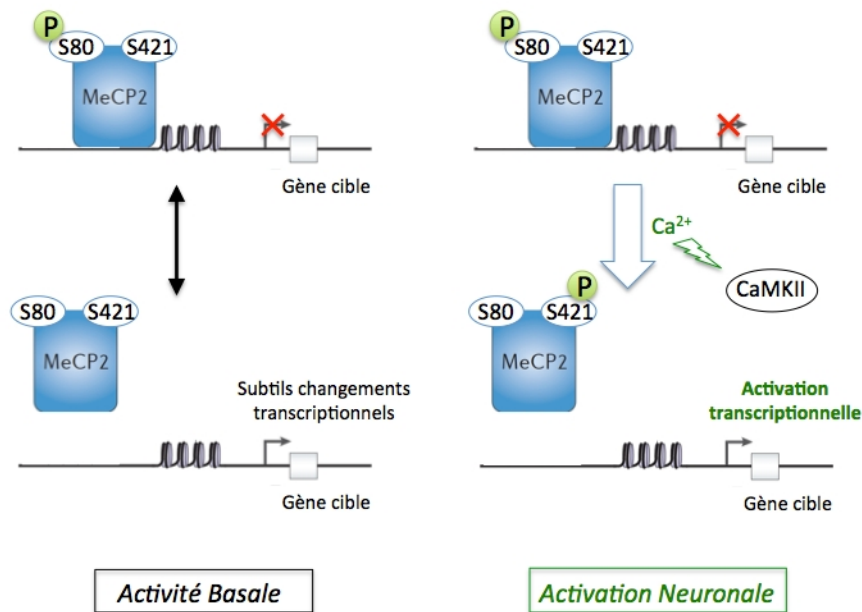


Figure 34 : Régulation de la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé via la phosphorylation des résidus Sérine 80 et 421 (d'après Zhou et coll., 2006 et Tao et coll., 2009)

Au repos, MeCP2 est phosphorylé au niveau de la Ser 80 et est lié à l'ADN méthylé. Lorsque la Ser 80 est déphosphorylée, MeCP2 se détache de l'ADN méthylé, ce qui induit des changements de la transcription d'un nombre limité de gènes.

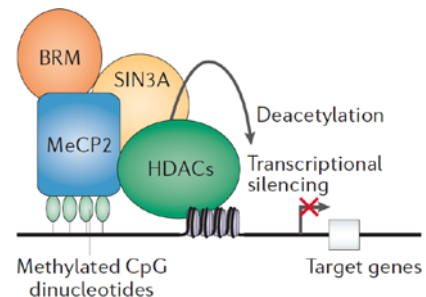
Lors d'une activation neuronale, la CaMKII phosphoryle la Ser 421 alors qu'on note parallèlement une diminution de la phosphorylation de la Ser 80. On observe un détachement global de MeCP2 de l'ADN méthylé, induisant une importante activation transcriptionnelle.

2.4. MeCP2 et régulation de la transcription

Comme nous l'avons vu, MeCP2 se lie à l'ADN méthylé *via* son domaine MBD, notamment au niveau des régions 5' régulatrices des gènes. Cette liaison est favorisée par la présence de 4 paires de bases adénosine/thymine adjacentes au dinucléotide CpG méthylé (Klose et coll., 2005). La présence du domaine TRD sur la protéine MeCP2 permet de recruter des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et de créer ainsi un environnement répresseur local. Parmi ces protéines, on trouve des histones déacétylases ou HDAC (Nan et coll., 1998), le co-répresseur Sin3A (Nan et coll., 1998) et des protéines de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP comme NuRD et SWI/SNF par exemple (Harikrishnan et coll., 2005). Il est évident que le complexe répresseur MeCP2/Sin3A n'est observé qu'une fois la méthylation de l'ADN établie dans l'embryon, en accord avec le profil spatio-temporel de l'expression de MeCP2.

Figure 35 : **Mécanisme de répression transcriptionnelle dépendant de MeCP2** (tirée de *Bienvenu et Chelly, 2006*)

MeCP2 se lie à l'ADN méthylé au niveau du promoteur *via* son domaine MBD. Il recrute différents facteurs comme le co-répresseur Sin3A, des HDAC et la protéine BRM ('*Brahma*', une protéine de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF). L'action conjointe de l'ensemble de ces facteurs induit une compaction de la chromatine, rendant le promoteur inaccessible à la machinerie transcriptionnelle, d'où la répression de la transcription.



La répression transcriptionnelle peut dans certains cas être induite de manière indirecte. MeCP2 réprime, entre autres, l'expression d'ARN interférents impliqués dans la régulation de gènes (Klein et coll., 2007). De ce fait, l'expression de ces gènes cibles est indirectement liée à MeCP2. C'est par exemple le cas du gène *UBE3A* codant l'ubiquitine ligase E3A.

MeCP2 peut par ailleurs réguler la transcription de gènes *via* la formation de boucles de régulation chromatiniennes. MeCP2 a en effet la capacité de déplacer l'histone H1 (Nan et coll., 1997 ; Ishibashi et coll., 2008) et de créer une interaction entre les histones et l'ADN par l'intermédiaire de ses domaines TRD et MBD (Nan et coll., 1998 ; Kumar et coll., 2008). Cette liaison de MeCP2 aux nucléosomes est associée à une condensation locale de la

chromatine, et donc à une répression transcriptionnelle locale. Elle pourrait se faire indépendamment de la méthylation de l'ADN (Marchi et coll., 2007), mais nécessite par contre une augmentation de la méthylation de l'histone H3 et une diminution de l'acétylation des histones (Nikitina et coll., 2007b). Les multiples interactions de MeCP2 avec différents nucléosomes peuvent aller jusqu'à induire la formation de boucles chromatiennes, permettant la régulation de l'expression de gènes mêmes très éloignés (Marchi et coll., 2007 ; Nikitina et coll., 2007a).

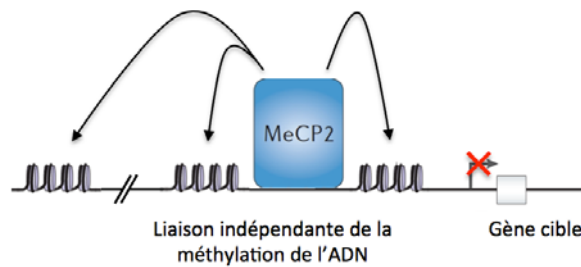


Figure 36 : **Répression transcriptionnelle via la liaison de MeCP2 aux nucléosomes** (adaptée de Bienvenu et Chelly, 2006)

MeCP2 a la capacité de se lier aux nucléosomes, indépendamment de la méthylation de l'ADN, ce qui induit une condensation locale de la chromatine, et donc une répression transcriptionnelle locale. Les multiples interactions de MeCP2 avec différents nucléosomes peuvent également induire la formation de boucles chromatiennes, permettant la régulation de l'expression de gènes même très éloignés.

Certaines études ont suggéré que MeCP2 ne serait pas uniquement associé à la répression de la transcription. Des travaux réalisés sur des cellules de neuroblastomes humains ont en effet montré qu'environ 63% des promoteurs auxquels MeCP2 est lié sont actifs, et que 6% seulement sont hyperméthylés (Yasui et coll., 2007). De plus, l'analyse du transcriptome de l'hypothalamus de souris, présentant soit une invalidation, soit une surexpression du gène *MeCP2*, indique que 85% des gènes seraient induits par MeCP2 (Chahrour et coll., 2008). Cette activation de la transcription par MeCP2 semble dépendre de la liaison de CREB au promoteur, peu méthylé, de ces gènes (Chahrour et coll., 2008). Ainsi, le rôle de MeCP2 en tant que répresseur ou activateur de la transcription serait plutôt déterminé par la nature des co-régulateurs présents (répresseurs ou activateurs de la transcription) (Cohen et coll., 2008). Il faut cependant garder en mémoire que l'activation de la transcription par MeCP2 n'a pour l'instant été décrite que dans un nombre limité d'études, et que par conséquent, MeCP2 reste majoritairement considéré comme un répresseur de la transcription.

3. Méthylation de l'ADN : modification stable mais néanmoins réversible

3.1. Méthylation de l'ADN et expression tissu-spécifique

Les premières études impliquant la méthylation de l'ADN dans la spécificité tissulaire de la transcription sont apparues au cours des années 90. L'établissement du profil de transcription tissu-spécifique s'effectue lors du développement embryonnaire, par une vague de déméthylation suivie d'une vague de méthylation *de novo* pendant la prégastrulation (Kafri et coll., 1992 ; Brandeis et coll., 1993 ; Ariel et coll., 1994). Des travaux plus récents ont permis d'identifier 150 régions différentiellement méthylées (DMR, '*Differentially Methylated Region*') et ont ainsi confirmé le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'expression tissu-spécifique de certains gènes (Brena et coll., 2006).

3.2. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale

Une soixantaine de gènes autosomiques ont été mis en évidence, présentant une expression monoallélique suite à la mise sous silence d'un des allèles parentaux. Ces gènes, organisés en '*clusters*', sont sous le contrôle d'un 'centre d'empreinte'. Le 'centre d'empreinte' est une région riche en dinucléotides CpG. Il présente un profil de méthylation différent pour chacun des deux allèles parentaux (Kottler, 2006), et qui est transmis de manière stable au cours des divisions cellulaires, tout au long de la vie de l'individu. Les cellules germinales sont les seules de l'organisme dans lesquelles le profil d'empreinte peut être effacé puis remis en place.

Il est important de préciser que l'empreinte parentale des gènes autosomiques est un processus essentiel au développement d'un organisme. Une dérégulation de ce processus est en effet associée à des syndromes de retard mental, comme le syndrome d'Angelman par exemple (Lalande, 1996).

3.3. Méthylation de l'ADN et inactivation du chromosome X

Un autre mécanisme stable au cours de la vie d'un individu et lié à la méthylation de l'ADN est le processus d'inactivation du chromosome X observé chez les mammifères femelles. Au cours du développement embryonnaire, on observe chez les mammifères femelles une inactivation transcriptionnelle de l'un des deux chromosomes X, permettant ainsi un dosage génique identique à celui des mâles XY. Le processus d'inactivation du chromosome X est régi à partir d'un locus particulier, le centre d'inactivation du chromosome

X (Xic) (Augui et coll., 2007). Le Xic contient un ARN régulateur non-codant *Xist* ('*X inactive specific transcript*') et son antisens *Tsix*. Lorsque *Xist* est transcrit, il interagit avec le chromosome X, entraînant son inactivation (Li, 2002). L'expression de *Xist* est rapidement suivie par l'intervention de HDAC et d'histones méthyltransférases (HMT), ce qui induit respectivement l'hypoacétylation des histones, et la méthylation de la Lysine (Lys) 20 de l'histone H4 et de la Lys 27 de l'histone H3. Le processus d'inactivation du chromosome X se poursuit par l'incorporation du variant d'histone macroH2A et enfin par une méthylation de l'ADN (Trojer et Reinberg, 2007).

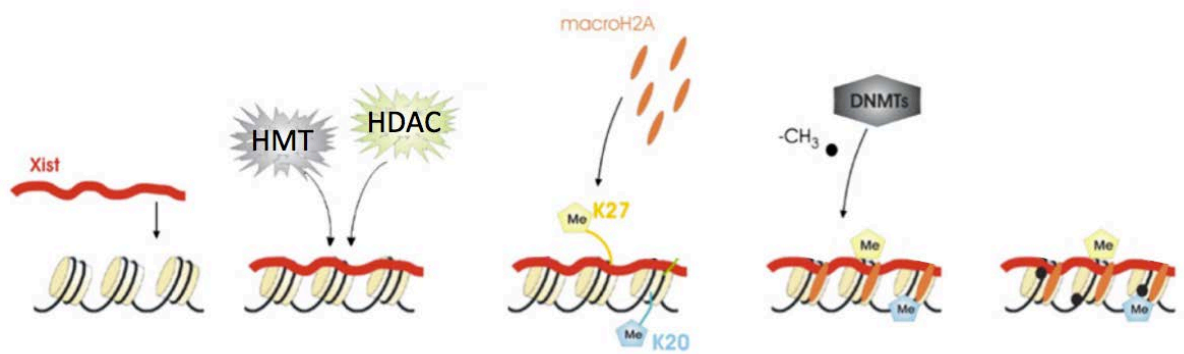


Figure 37 : **Processus d'inactivation du chromosome X** (adaptée de Trojer et Reinberg, 2007)

L'ARN *Xist* se lie au chromosome X, ce qui est rapidement suivi par l'intervention notamment de HDAC et de HMT (ou HKT), induisant l'hypoacétylation des histones et la méthylation de la Lys 20 (meK20) de l'histone H4 et de la Lys 27 (meK27) de l'histone H3. On observe ensuite l'incorporation du variant d'histone macroH2A et enfin une méthylation de l'ADN catalysée par les DNMT.

L'inactivation du X s'effectue au stade 4-8 cellules du développement embryonnaire. Elle est soumise au processus d'empreinte parentale au niveau du locus Xic (Okamoto et coll., 2004) et est aléatoire (Sado et coll., 2001). Ainsi, l'allèle paternel est exprimé dans certaines cellules et l'allèle maternel dans d'autres, ce qui aboutit à une mosaïque cellulaire (Fatemi et Wade, 2006). Cette mosaïque cellulaire est notamment illustrée par l'exemple des chattes calicot.

3.4. Déméthylation de l'ADN

Du fait de son implication dans les processus précédemment décrits, la méthylation de l'ADN est classiquement considérée comme une modification stable. Néanmoins, l'existence de vagues de déméthylation au cours du développement embryonnaire indique que la méthylation de l'ADN est une réaction réversible. De plus, une étude réalisée sur des cellules de cancer du sein a montré l'existence de profils de méthylation dynamiques, confirmant la réversibilité de la méthylation de l'ADN (Metivier et coll., 2008). En effet, une méthylation périodique du promoteur du gène *Tff1* (*Trefoil factor 1*) est observée toutes les 5 à 15 minutes en réponse aux oestrogènes, chaque cycle de méthylation étant directement corrélé à la liaison de MeCP2, au recrutement de co-répresseurs, et *in fine* à la répression transcriptionnelle du gène. Au contraire, l'activation de la transcription du gène induite par les oestrogènes est associée à la liaison périodique du récepteur α aux oestrogènes et de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène (Kangaspeska et coll., 2008).

Pourtant, aucune déméthylase n'a à ce jour été identifiée. On sait depuis longtemps qu'une déméthylation passive de l'ADN a lieu en cas de diminution de l'activité des DNMT. Depuis peu, trois familles d'enzymes ont été impliquées dans des processus de déméthylation active de l'ADN, *via* notamment des mécanismes de réparation de l'ADN (pour revue : Bhutani et coll., 2011).

- (1) Les protéines de la famille Tet (*'ten-eleven translocation'*) hydroxylient les 5-méthylcytosines (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC), celles-ci pouvant encore être oxydées en 5-formylcytosines (5fC) et en 5-carboxylcytosines (5caC).
- (2) Les 5mC, tout comme les 5hmC, peuvent être déaminées par les membres de la famille AID/APOBEC, formant ainsi des 5-méthyluraciles (5mU) ou des 5-hydroxyméthyluraciles (5hmU), respectivement.
- (3) Le remplacement de ces différents intermédiaires (5mU, 5hmU ou 5caC) est initié par des glycosylases de la famille BER (*'Base Excision Repair'*), comme TDG ou SMUG1.

L'ensemble des mécanismes mis en jeu dans la déméthylation de l'ADN est représenté dans la figure 38.

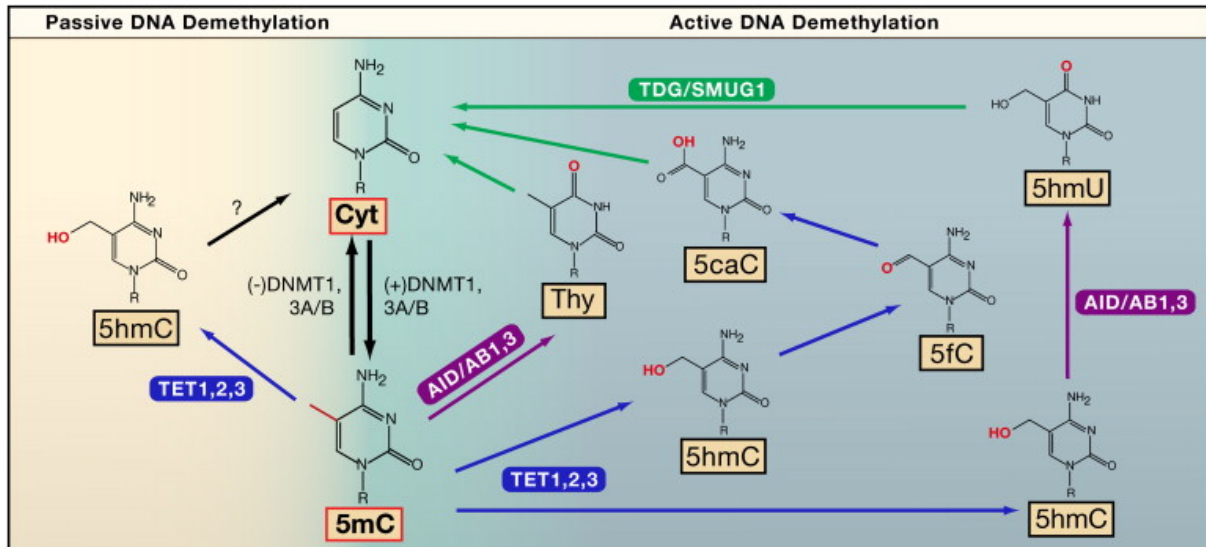


Figure 38 : Mécanismes mis en jeu dans la déméthylation de l'ADN (tirée de Bhutani et coll., 2011)

Une déméthylation passive de l'ADN est observée en cas de diminution de l'activité DNMT. Les processus de déméthylation active de l'ADN nécessitent l'intervention d'enzymes de trois familles différentes : la famille Tet (les réactions catalysées par les enzymes de cette famille sont représentées en bleu), la famille AID/APOBEC (les réactions catalysées par les enzymes de cette famille sont représentées en violet) et la famille BER (les réactions catalysées par les enzymes de cette famille sont représentées en vert).

Tet, 'Ten-eleven translocation' ; *BER*, 'Base Excision Repair' ; *Cyt*, cytosines ; *5mC*, 5-méthylcytosines ; *5hmC*, 5-hydroxyméthylcytosines ; *5fC*, 5-formylcytosines ; *5caC*, 5-carboxylcytosines ; *Thy*, thymine ; *5hmU*, 5-hydroxyméthyluraciles.

B. Modifications post-traductionnelles des histones

Outre la méthylation de l'ADN, la structure de la chromatine peut également être modulée par la mise en place de modifications post-traductionnelles des histones. Ces modifications ont essentiellement lieu au niveau de l'extrémité N-terminale des histones. On en dénombre 9 types différents : l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la SUMOylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, la déimination et la glycoxydation. Dans cette partie, nous nous limiterons aux modifications post-traductionnelles des histones les mieux caractérisées, à savoir l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation.

Ces modifications s'effectuent au niveau de résidus particuliers et sont catalysées par des enzymes spécifiques. Les modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles et particulièrement dynamiques.

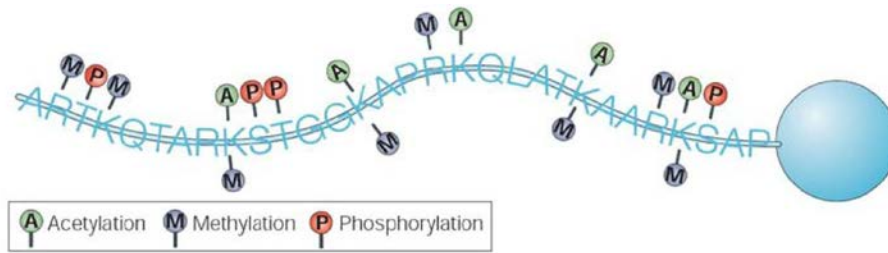


Figure 39 : **Illustration schématique des principales modifications post-traductionnelles des histones (30 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de l'histone H3)**
(tirée de Levenson et Sweatt, 2005)

1. Acétylation des histones

L'acétylation des histones est généralement associée à l'activation de la transcription (Marushige, 1976 ; Brownell et Allis, 1996). La réaction d'acétylation a exclusivement lieu au niveau de résidus Lys. Elle consiste en un transfert du groupement acétyle porté par une molécule d'acétyl-coenzyme A sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu Lys.

L'acétylation des histones permet de neutraliser la charge positive du résidu Lys, ce qui entraîne une modification des interactions électrostatiques entre l'ADN et les histones. Elle favorise également l'ancrage de protéines régulatrices impliquées dans l'établissement et/ou la stabilisation de l'euchromatine (de la Cruz et coll., 2005). L'ensemble de ces modifications permet d'obtenir une chromatine plus flexible, plus ouverte, et donc de faciliter l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, ce qui induit *in fine* l'activation de la transcription (Strahl et Allis, 2000).

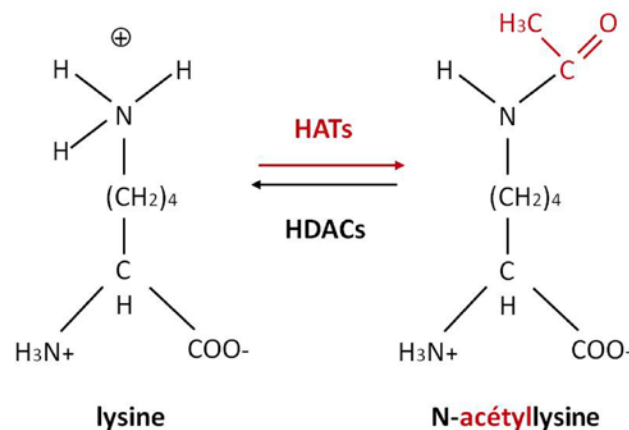


Figure 40 : **Réaction d'acétylation des histones et enzymes impliquées**
HATs, histones acétyltransférases ; *HDACs*, histones déacétylases.

L'acétylation des histones est régulée par les histones acétyltransférases (HAT), la réaction réverse étant catalysée par les HDAC (Roth et coll., 2001 ; Walkinshaw et coll., 2008). Les HAT et les HDAC sont en général associées à d'autres protéines, formant des complexes multiprotéiques. En plus de l'acétylation/déacétylation des histones, ces complexes protéiques assurent parfois la liaison avec des facteurs de transcription, le couplage à des promoteurs spécifiques ou encore la reconnaissance du substrat chromatinien.

Les HAT peuvent être divisées en deux types en fonction de leur localisation subcellulaire (Roth et coll., 2001). Les HAT de type A sont nucléaires, et sont donc en charge de l'acétylation des histones nucléosomales. Elles comprennent 5 familles : la famille des GNAT ('*GCN5-related acetyltransferases*'), la famille p300/CBP, la famille MYST ('*MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and Tip60*'), les HAT des facteurs de transcription et les HAT associées aux récepteurs nucléaires (Selvi et coll., 2010). Les HAT de type B, cytoplasmiques, sont impliquées dans l'acétylation des histones néosynthétisées, avant leur transport dans le noyau et leur intégration dans la chromatine (Ruiz-Carrillo et coll., 1975). Ce groupe est constitué d'un membre unique, HAT1 (Selvi et coll., 2010).

Chez les mammifères, les HDAC sont au nombre de 18, regroupées en 4 classes selon leur fonction et leur localisation subcellulaire (Gregoretto et coll., 2004). Les HDAC de la classe I (HDAC1, 2, 3 et 8) sont strictement nucléaires. Les HDAC de la classe II, au contraire, transitent entre le cytoplasme et le noyau, au gré de leur niveau de phosphorylation (Ellis et coll., 2003 ; Gregoretto et coll., 2004 ; Backs et coll., 2006). La classe II est subdivisée en deux sous-classes : la classe IIa (HDAC4, 5, 7 et 9) et la classe IIb (HDAC6 et 10). HDAC11 est le seul membre de la classe IV (de Ruijter et coll., 2003). L'ensemble de ces HDAC présente une activité catalytique dépendant de la présence du cofacteur Zn^{2+} . Les HDAC de la classe III, par contre, dépendent du cofacteur '*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*' (NAD^+). Elles appartiennent à la famille des sirtuines, qui sont cytoplasmiques (Sirt1 et 2), mitochondriales (Sirt3, 4 et 5) ou encore nucléaires (Sirt1, 6 et 7).

2. Phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones s'effectue au niveau de résidus Ser et Thr (Nowak et Corces, 2004). Tout comme l'actétylation, elle est généralement associée à une activation de la transcription (Loury et Sassone-Corsi, 2003). La charge négative apportée par le groupement phosphate crée une force répulsive entre l'ADN et l'histone, tous deux étant chargés négativement, ce qui entraîne le relâchement de la chromatine. La réaction de phosphorylation

est catalysée par des Ser/Thr protéine kinases. Etonnamment, malgré la multitude de kinases présentes dans la cellule, seule MSK1/2 (*Mitogen- and Stress-activated kinase 1 and 2*) semble être impliquée à ce jour dans la phosphorylation des histones (Thomson et coll., 1999).

La déphosphorylation des histones est quant à elle assurée par des Ser/Thr protéine phosphatases, dont PP1, PP2A et PP4 (Hsu et coll., 2000 ; Nowak et Corces, 2004 ; Nakada et coll., 2008).

3. Méthylation des histones

La méthylation des histones s'effectue au niveau des résidus Lys et Arginine (Arg). Elle peut être associée aussi bien à une activation qu'à une répression de la transcription (Peters et Schubeler, 2005 ; Klose et Zhang, 2007). Tout dépend du résidu considéré et du degré de méthylation. En effet, on trouve trois degrés différents de méthylation de la Lys : la mono-, la di- et la triméthylation (Akbarian et Huang, 2009). Les résidus Arg ne peuvent être que mono- ou diméthylés. Chaque degré de méthylation régule différemment la transcription des gènes. Ceci semble notamment dû au fait que les protéines effectrices, comme les co-activateurs transcriptionnels, ont des affinités différentes pour ces formes diversement méthylées (Klose et Zhang, 2007). Ainsi, la triméthylation de la Lys 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est associée à une activation transcriptionnelle, alors que la monométhylation de ce même résidu (H3K4me) peut aussi bien favoriser que réprimer la transcription. Il semble que la localisation de la méthylation des histones dans une région génomique donnée soit également impliquée dans la régulation de la transcription (pour revue : Li et coll., 2007). En effet, la transcription des gènes serait préférentiellement régulée par les marques situées à proximité du site d'initiation de la transcription par rapport à celles présentant une localisation plus éloignée.

La réaction de méthylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu Lys ou Arg, la S-adénosyl-L-méthionine étant le donneur de méthyle (Zhang et Reinberg, 2001). Cette réaction est catalysée par des histones méthyltransférases (HMT). La réaction inverse, la déméthylation des histones, est quant à elle assurée par des histones déméthylases (HDM).

Les HMT peuvent être divisées en 3 familles (Bedford, 2007). La famille des Arginine-méthyltransférases, comme son nom l'indique, est en charge de la méthylation des résidus Arg. On en dénombre 10, réparties en 4 classes (Kouzarides, 2007). La famille des enzymes à domaine SET (*'Su(var)39 Enhancer Trithorax'*) contient 28 protéines méthylant spécifiquement les résidus Lys, réparties en 4 classes distinctes : SET1, SET2, RIZ (*'Retinoblastoma protein-interacting zinc finger'*) et SUV39 (*'Suppressor of variegation 39'*) (Kouzarides, 2002). Enfin, la dernière famille de HMT est constituée des méthyltransférases associées aux membranes.

Concernant la déméthylation, différentes HDM ont été identifiées. On peut citer les déméthylases spécifiques des résidus Lys, la peptidylarginine déiminase (PADI) ou encore les déméthylases à domaine jumonji-C (JMJC) (Klose et Zhang, 2007).

Il est intéressant de noter que les différentes modifications épigénétiques ne sont pas indépendantes les unes des autres, mais qu'elles agissent de concert pour réguler finement la transcription des gènes. On sait par exemple que l'ubiquitinylation de l'histone H2B est nécessaire à la triméthylation de la Lys 4 de l'histone H3 (Lee et coll., 2007). De même, la méthylation de la Lys 4 de l'histone H3 à proximité d'îlots CpG inhiberait la méthylation de ces îlots (Fan et coll., 2008), alors que la méthylation de la Lys 9 de l'histone H3 serait au contraire nécessaire à la méthylation des îlots CpG (Martin et Zhang, 2005).

III. PP1 et modifications épigénétiques

Comme nous l'avons vu précédemment, PP1 est l'une des phosphatases assurant la déphosphorylation des histones (Hsu et coll., 2000 ; Nowak et Corces, 2004). Au vu des interactions entre les différentes marques épigénétiques précédemment citées, PP1 pourrait également être impliquée dans d'autres mécanismes épigénétiques. Il a en effet été montré que PP1 peut s'associer à différents composants des complexes épigénétique comme HDAC1 (Canettieri et coll., 2003 ; Koshibu et coll., 2009) ou l'histone déméthylase JMJD2A (Koshibu et coll., 2009). La dissociation du complexe HDAC1/PP1, suite à l'inhibition génétique de la fraction nucléaire de PP1, est en effet corrélée à une diminution de l'activité HDAC, indiquant que l'association HDAC1/PP1 régule l'activité déacétylase de HDAC1

(Koshibu et coll., 2009). Le même type de mécanisme serait mis en jeu dans le cas du complexe JMJD2A/PP1 (Koshibu et coll., 2009).

Ainsi, PP1 est impliquée non seulement dans la déphosphorylation des histones, mais également dans la déacétylation et la déméthylation des histones. Ceci est notamment confirmé par le fait que l'inhibition génétique de la fraction nucléaire de PP1 est associée non seulement à une augmentation de la phosphorylation de la Ser 10 de l'histone H3, mais aussi à une augmentation de l'acétylation de la Lys 14 de l'histone H3 et de la Lys 5 de l'histone H4, et à une augmentation de la triméthylation de la Lys 36 de l'histone H3 (Koshibu et coll., 2009 et 2011). Chez *Neurospora*, la délétion de PP1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de la Ser 10 de l'histone H3 et une diminution de la méthylation de l'ADN, indiquant que la déphosphorylation de la Ser 10 de l'histone H3 par PP1 est nécessaire à la méthylation de l'ADN sur les sites voisins (Adhvaryu et Selker, 2008). La fraction nucléaire de PP1 régule donc différentes modifications épigénétiques, dont les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN.

IV. Transmission des modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont réputées se transmettre de la cellule mère aux cellules filles. Cette transmission a lieu au cours du développement embryonnaire et durant la mitose.

Au cours du développement embryonnaire, on observe deux périodes caractérisées par un remaniement global de la méthylation de l'ADN, le stade blastocyste et la gamétogénèse. Chacune de ces deux périodes débute par une vague de déméthylation massive de l'ADN, suivie d'une vague de méthylation tout aussi importante, qui pourrait notamment impliquer les DNMT3A et 3B (Li, 2002). Ces deux vagues successives permettent ainsi une reprogrammation globale de la méthylation du génome. C'est pendant la deuxième période, au cours de la gamétogénèse, que l'empreinte parentale est mise en place. Les gamètes femelles et mâles n'ont donc pas le même profil de méthylation pour les différents gènes à empreinte. La mise en place correcte de l'empreinte parentale est nécessaire au développement de l'embryon (Rousseaux et coll., 2004).

En ce qui concerne la mitose, on observe une séparation des deux brins d'ADN symétriquement méthylés, puis une association de chacun de ces brins avec un brin

complémentaire néosynthétisé, non méthylé, aboutissant à une hémi-méthylation transitoire. Celle-ci est rapidement rendue symétrique par la DNMT de maintenance, la DNMT1 (Wolffe et Matzke, 1999). C'est par ces mécanismes que le profil de méthylation d'un gène est maintenu au cours des divisions cellulaires. Les histones sont quant à elles réparties entre les deux cellules filles, suite au désassemblage des nucléosomes. Cette répartition semble aléatoire et équilibrée (Li et coll., 2007) et nécessite la néosynthèse d'histones afin de rétablir le nombre correct de protéines histones dans chacune des deux cellules filles.

V. Plasticité des modifications épigénétiques

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, les modifications épigénétiques sont réversibles, ce qui suggère une évolution dynamique de ces mécanismes au cours de la vie d'un individu, au fil de ses expériences.

A. Modifications épigénétiques : 'mémoire' de l'expérience individuelle

Différents facteurs environnementaux, comme l'apprentissage, le stress, l'alimentation ou des agents pharmacologiques, peuvent entraîner la mise en place de marques épigénétiques ou la modification des marques préexistantes.

Des études chez le Rat ont par exemple montré qu'un soin maternel intense au cours de l'allaitement est corrélé à une meilleure gestion du stress de la descendance à l'âge adulte. Celle-ci est associée, dans l'hippocampe et l'hypothalamus, à une diminution de la méthylation du promoteur du gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes et de celui codant le récepteur aux oestrogènes, ainsi qu'à une augmentation de l'acétylation des histones sur ces mêmes promoteurs (Weaver et coll., 2004 ; Champagne et coll., 2006). Cette corrélation entre expérience individuelle, comportement et modifications épigénétiques a été confirmée chez l'Homme. En effet, un stress exacerbé de type maltraitance ou abus sexuel au cours de l'enfance est corrélé à une modification du profil de méthylation du promoteur du gène codant les récepteurs aux glucocorticoïdes, dans l'hippocampe et les cellules mononucléaires du sang, et à une augmentation du risque de suicide à l'âge adulte (Turner et coll., 2008 ; McGowan et coll., 2009).

D'autres études ont montré qu'un apprentissage induit des modifications épigénétiques dans les structures cérébrales impliquées dans les processus d'apprentissage et

de mémoire, comme l'hippocampe et le CxPF. Ainsi, l'acétylation de l'histone H3 est augmentée dans l'hippocampe, 1 h après un conditionnement de peur au contexte (Levenson et coll., 2004). Ces observations ont rapidement été complétées : le conditionnement de peur au contexte n'induit pas uniquement l'acétylation de l'histone H3, mais également celle de l'histone H4 (Francis et coll., 2009 ; Peleg et coll., 2010), ainsi qu'une modification de la méthylation de certains promoteurs de gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Miller et Sweatt, 2007). En effet, 2 h après le conditionnement de peur au contexte, on observe une diminution de la méthylation du gène de la *Reeline*, considéré comme un gène 'pro-mnésiant' et une augmentation de celle du gène *PP1C β* , considéré comme un gène 'suppresseur d'apprentissage et de mémoire', ces modifications des profils de méthylation étant associées à des modifications transcriptionnelles (Miller et Sweatt, 2007). Ces modifications épigénétiques sont transitoires, puisque le niveau de base (correspondant à celui mesuré chez les animaux contrôles) est à nouveau atteint 24 h après l'apprentissage (Levenson et coll., 2004 ; Miller et Sweatt, 2007). D'autres marques épigénétiques mises en place suite à un apprentissage sont au contraire beaucoup plus stables. Des changements durables de la méthylation de l'ADN ont pu être mis en évidence dans le CxPF un mois après le conditionnement de peur au contexte (Miller et coll., 2010). La méthylation du promoteur du gène de la *calcineurine* par exemple est encore présente 30 jours après le conditionnement de peur au contexte. De manière intéressante, un traitement des animaux avec des agents déméthylants, 29 jours après le conditionnement de peur au contexte, provoque des déficits de la mémoire ancienne, évaluée le 30^{ème} jour après le conditionnement (Miller et coll., 2010). Ces données suggèrent donc que des modifications stables du profil de méthylation de certains gènes, comme la *calcineurine*, semblent nécessaires au stockage à plus long terme des souvenirs.

L'implication des modifications épigénétiques dans les processus mnésiques a également été confirmée par plusieurs études réalisées sur des souris mutées, soit pour certaines DNMT, soit pour certaines HAT. L'inactivation génétique du gène de la *DNMT1* et/ou du gène de la *DNMT3A* dans le cerveau antérieur a permis de montrer que l'activité combinée des DNMT1 et 3A est nécessaire à la LTP, ainsi qu'à la formation de la mémoire spatiale et de la mémoire de peur au contexte (Feng et coll., 2010). De même, la perte sélective de l'activité HAT de CBP dans le cerveau antérieur, à l'âge adulte, est associée à des déficits sévères de la maintenance de la LTP, et à des troubles de la mémoire spatiale à long terme, évaluée en piscine de Morris 24 h après la fin de l'acquisition (Korzus et coll., 2004 ;

Wood et coll., 2005). L'importance de l'acétylation des histones dans les processus mnésiques est également soulignée par les résultats obtenus lors de traitements avec des inhibiteurs de HDAC, ce type de traitement induisant une augmentation de la LTP, ainsi qu'une amélioration des performances mnésiques (Levenson et coll., 2004 ; pour revue : Gräff et coll., 2011).

La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont donc influencées par les facteurs environnementaux tout au long de la vie d'un individu. Ces modifications contribuent à l'évolution du phénotype de chaque individu au cours du temps et pourraient ainsi constituer une sorte de 'mémoire' de l'expérience individuelle (Siegmund et coll., 2007). Cette hypothèse est particulièrement bien illustrée chez les jumeaux homozygotes. Bien que ceux-ci soient dotés d'un patrimoine génétique identique, des différences de phénotype entre les deux jumeaux sont observées à l'âge adulte, notamment au niveau du comportement ou de la susceptibilité à développer certaines pathologies, comme des troubles psychiatriques ou le diabète. Ces discordances phénotypiques sont corrélées à des profils de méthylation du génome spécifiques à chacun des jumeaux, qui pourraient donc sous-tendre l'expression différentielle, entre les deux jumeaux, de certains gènes clés impliqués dans l'expression de ces phénotypes (Tsujita et coll., 1998 ; Fraga et coll., 2005 ; Haque et coll., 2009). Il est intéressant de souligner que ces différences sont d'autant plus importantes quand les jumeaux ont passé peu de temps ensemble et/ou ont eu une histoire médicale différente (Fraga et coll., 2005), confirmant le rôle de l'expérience individuelle dans la mise en place des marques épigénétiques et l'expression du phénotype.

B. Modifications épigénétiques et cocaïne

Bien que beaucoup d'individus consomment de la drogue de façon régulière, nous avons vu que seule une minorité perd le contrôle de la consommation et bascule dans un comportement compulsif de recherche et de prise de drogue caractéristique de la dépendance, des facteurs de vulnérabilité et de susceptibilité génétique participant à l'installation de la dépendance. Certains comportements, comme le '*craving*' et la rechute, peuvent être observés chez un patient dépendant, même après des dizaines d'années d'abstinence. C'est pourquoi, ils résulteraient vraisemblablement de modifications à long-terme du système de récompense, impliquant des altérations durables de l'expression de certains gènes. Or, les mécanismes épigénétiques sont dynamiquement régulés par l'expérience individuelle et sous-tendent, dans

certains cas, des modifications stables et durables de l'expression des gènes. Ces mécanismes présentent donc une cinétique permettant d'expliquer les effets à long-terme des drogues. Ils représentent ainsi des mécanismes susceptibles de participer aux neuroadaptations durables induites par l'exposition répétée aux drogues, à l'origine de la dépendance.

Au cours de ces dernières années, différentes études se sont de ce fait intéressées aux mécanismes de régulation épigénétique mis en jeu suite à la consommation de drogue, et aux effets de la modulation de ces mécanismes sur les réponses comportementales des animaux aux drogues. Dans cette partie, nous nous limiterons aux modifications post-traductionnelles des histones, notamment à l'acétylation des histones, et à la méthylation de l'ADN.

1. Modifications post-traductionnelles des histones et cocaïne

De nombreuses drogues induisent des changements dans l'acétylation des histones (pour revues : Renthall et Nestler, 2008 ; Maze et Nestler, 2011). Les premières études à avoir mis en évidence un lien entre acétylation des histones et cocaïne sont parues en 2005. Il a en effet été montré qu'un traitement aux inhibiteurs de HDAC (acide valproïque) perturbait les effets comportementaux de la cocaïne, en inhibant de manière dose dépendante la mise en place de la sensibilisation comportementale (Li et coll., 2005). Une seconde étude a quant à elle mis en évidence qu'un traitement aigu à la cocaïne induisait dans le NAc une augmentation rapide et transitoire de l'acétylation de H4 et de la phospho-acétylation de H3 au niveau du promoteur du gène *c-fos*, ainsi que de l'acétylation de H4 au niveau du promoteur du gène *FosB*. Il a par ailleurs été observé qu'un traitement avec un autre inhibiteur de HDAC, l'acide butyrique, potentialisait la mise en place de la sensibilisation comportementale (Kumar et coll., 2005). Dans la foulée, notre équipe a pour la première fois démontré l'implication du complexe MeCP2/HDAC2 dans les effets d'une exposition répétée à la cocaïne, l'augmentation de MeCP2 induite par un traitement chronique par la cocaïne étant corrélée à une diminution de l'acétylation des Lys 9 et 14 de l'histone H3 (Cassel et coll., 2006), deux résidus décrits comme étant déacétylés par l'activité HDAC associée à MeCP2 (Shahbazian et coll., 2002a). Bien que l'interprétation de ses différentes études soit compliquée notamment par les effets comportementaux radicalement opposés induits par le traitement aux inhibiteurs de HDAC, elles démontrent malgré tout clairement que la cocaïne régule dynamiquement l'acétylation des histones, et que ces modifications épigénétiques participent aux effets comportementaux de la cocaïne.

Plusieurs auteurs se sont par la suite intéressés aux conséquences d'une modulation du degré d'acétylation des histones sur les effets comportementaux de la cocaïne. Néanmoins, les effets d'un traitement par des inhibiteurs de HDAC diffèrent selon les approches techniques, en fonction de la durée du traitement ou du type de traitement utilisé. Si l'administration systémique ou intra-NAc d'inhibiteurs de HDAC potentialise la préférence de place conditionnée et augmente les réponses locomotrices à la cocaïne (Kumar et coll., 2005 ; Renthall et coll., 2007 ; McQuown et Wood, 2010), un traitement prolongé par des inhibiteurs de HDAC diminue l'AA de cocaïne (Romieu et coll., 2008), tout comme l'activité locomotrice induite par l'amphétamine (Kim et coll., 2008), probablement *via* la mise en place de mécanismes adaptatifs compensatoires.

Les inhibiteurs de HDAC n'étant pas sélectifs de l'une ou l'autre HDAC, d'autres travaux ont étudié les effets de la surexpression ou de la délétion génétique de HDAC particulières. Il a ainsi été montré que la surexpression de HDAC4 ou HDAC5 est associée à une diminution des réponses comportementales à la cocaïne (Kumar et coll., 2005 ; Renthall et coll., 2007), alors que la délétion génétique de HDAC5 induit une hypersensibilité aux effets chroniques de la drogue (Renthall et coll., 2007). A l'opposé, l'inhibition pharmacologique d'une autre classe de HDAC, les sirtuines (HDAC de la classe III), diminue la préférence de place et l'AA de cocaïne, alors que leur activation augmente les effets renforçants de la cocaïne (Renthall et coll., 2009). Ces différents résultats soulignent donc l'importance d'identifier précisément les HDAC impliquées dans les effets comportementaux de la cocaïne, afin de mieux comprendre le lien entre acétylation des histones et cocaïne.

Outre l'acétylation des histones, la méthylation des histones est également modulée par la cocaïne. Une diminution globale de la diméthylation de la Lys 9 de l'histone H3 est observée dans le NAc, suite à un traitement chronique à la cocaïne (Maze et coll., 2010). Des analyses du génome entier ont cependant permis de montrer que la diméthylation de la Lys 9 de l'histone H3 est augmentée sur certains promoteurs de gènes, mais diminuée sur d'autres (Renthall et coll., 2009). La cocaïne induit donc des changements de méthylation des histones qui dépendent des gènes considérés. La diminution globale de la diméthylation de la Lys 9 de l'histone H3 observée en réponse à un traitement chronique est probablement due à la diminution d'expression de deux HMT responsables de cette diméthylation, G9a et la protéine '*G9a-like*' (GLP) (Maze et coll., 2010). Ces adaptations potentialisent les effets de la cocaïne, puisque l'inactivation du gène *G9a* ou l'inhibition pharmacologique de G9a dans le NAc

augmentent toutes deux les comportements induits par la cocaïne, ainsi que la densité d'épines dendritiques des neurones épineux de taille moyenne, alors que la surexpression de *G9a* entraîne des effets opposés.

Les modifications post-traductionnelles des histones, comme l'acétylation et la méthylation, sont donc fortement impliquées dans les effets de la cocaïne. Les mécanismes mis en jeu étant particulièrement complexes, de nombreux travaux restent néanmoins nécessaires afin de clarifier l'implication de ces modifications épigénétiques dans les effets comportementaux et les neuroadaptations liées à la cocaïne.

2. Méthylation de l'ADN et cocaïne

Dans un article paru en 2006, notre équipe a montré pour la première fois que des injections répétées de cocaïne augmentent l'expression des protéines de liaison à l'ADN méthylé MeCP2 et MBD1 dans le CPu et le CxPF de Rat, suggérant que des mécanismes impliquant la méthylation de l'ADN pouvaient également être mis en jeu par la cocaïne (Cassel et coll., 2006). Plus récemment, des travaux réalisés par notre équipe ont effectivement montré que des changements de méthylation de l'ADN sont induits par la cocaïne dans l'encéphale de Rat, à l'âge adulte, puisque la répression du gène *CDKL5* par la cocaïne résulte de l'hyperméthylation de sa région 5' régulatrice (Carouge et coll., 2010).

Plusieurs études ont par la suite confirmé l'implication de MeCP2 dans les effets des psychostimulants. La diminution de MeCP2 dans le striatum *via* un lentivirus entraîne une diminution de la prise de cocaïne dans des conditions d'accès étendu à la drogue (Im et coll., 2010). De la même manière, les souris *Mecp2*^{308/Y} exprimant une protéine MeCP2 tronquée en position C-terminale présentent une diminution de la sensibilisation locomotrice et de la préférence de place suite à un traitement chronique par l'amphétamine (Deng et coll., 2010). Cependant, les auteurs ont montré dans la même étude que la diminution virale de l'expression de MeCP2 dans le NAc est associée à une augmentation de la préférence de place à l'amphétamine, et que la surexpression de MeCP2 dans cette même structure induit une diminution de la préférence de place. Bien que l'interprétation de ces différents résultats soit difficile, ils témoignent malgré tout de l'implication de MeCP2 dans les effets comportementaux de la cocaïne.

Le lien entre cocaïne et méthylation de l'ADN est également souligné par le fait qu'un traitement chronique par la cocaïne régule dynamiquement l'expression des *DNMT3A* et *3B* dans le NAc (Kim et coll., 2008 ; LaPlant et coll., 2010). On observe notamment une diminution transitoire de l'expression de la *DNMT3A* dans les premières phases du sevrage, suivie d'une augmentation soutenue de son expression plus tardivement (Laplant et coll., 2010). Par ailleurs, la surexpression de la *DNMT3A* diminue la préférence de place à la cocaïne et augmente la densité d'épines dendritiques des neurones épineux de taille moyenne du NAc. A l'opposé, la diminution de l'expression de la *DNMT3A* induit une augmentation des effets comportementaux de la cocaïne (LaPlant et coll., 2010). Ces résultats indiquent par conséquent que la *DNMT3A* est impliquée à la fois dans la régulation de la plasticité structurale induite par la cocaïne et dans les effets comportementaux observés en réponse à la cocaïne. Il est intéressant de noter que l'injection d'inhibiteurs de DNMT dans l'hippocampe perturbe l'acquisition de la préférence de place pour la cocaïne, et que lorsque cette même injection est effectuée dans le cortex prélimbique (CxPF), elle entraîne l'inhibition de l'expression de la préférence de place (Han et coll., 2010). La méthylation de l'ADN jouerait donc également un rôle majeur dans les processus d'apprentissage et de mémoire liés à la drogue.

Au vu de l'ensemble des données présentées précédemment, il est évident que les différentes neuroadaptations induites par la cocaïne sont en partie sous-tendues par des modifications épigénétiques, comme les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN, et que celles-ci participent de ce fait aux effets comportementaux de la cocaïne. Cependant, des interprétations claires sont difficiles en raison de la complexité des mécanismes mis en jeu. De nombreuses études restent donc à réaliser afin de décrypter les mécanismes épigénétiques induits par la cocaïne et de comprendre leur implication dans les neuroadaptations liées à la cocaïne, et *in fine* dans la dépendance.

OBJECTIFS DE THESE

La dépendance aux drogues est associée à des changements à long-terme dans le comportement des individus, dont le ‘*craving*’ et la rechute. Au niveau cérébral, la prise répétée de drogue est corrélée à des phénomènes de plasticité structurale et synaptique dans les principales structures du système de récompense (pour revue : Russo et coll., 2010). Ces phénomènes étant persistants, ils sont de ce fait candidats pour sous-tendre les changements comportementaux observés dans la dépendance.

PP1 est fortement impliquée dans les processus de plasticité synaptique et structurale (pour revue : Ceulemans et Bollen, 2004). Elle se situe en outre au cœur des voies de signalisation mises en jeu dans le striatum par l’activation des récepteurs D1 de la DA et des récepteurs NMDA du Glu (pour revue : Svenningsson et coll., 2004). PP1 est donc susceptible de participer aux effets immédiats mais également à long-terme de la cocaïne. Des données antérieures de notre équipe obtenues par la technique des ‘*microarrays*’ ont permis d’identifier 147 gènes différentiellement régulés par la cocaïne dans le cerveau de Rat, dont le gène *PP1C β* codant la sous-unité catalytique β de PP1. Nous nous sommes par conséquent intéressés dans un premier temps aux mécanismes de régulation de l’expression du gène *PP1C β* par la cocaïne.

L’expression d’un gène peut être contrôlée par divers processus, dont les modifications épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques régulent la transcription des gènes *via* un remodelage de la structure de la chromatine (pour revue : Trojer et Reinberg, 2007). Ils sont dynamiquement régulés par les stimuli environnementaux et l’expérience individuelle et sous-tendent, dans certains cas, une modification stable et durable de l’expression des gènes. Ils pourraient ainsi participer aux neuroadaptations durables induites par la consommation répétée de drogue, à l’origine de la dépendance (pour revues : Maze et Nestler, 2011 ; Robison et Nestler, 2011). Notre équipe a montré que l’expression de différents facteurs épigénétiques, dont la protéine de liaison à l’ADN méthylé MeCP2, est modulée par la prise de cocaïne (Cassel et coll., 2006 ; Host et coll., 2011). Nous avons par ailleurs montré pour la première fois que la cocaïne était capable d’induire la méthylation d’un gène dans le cerveau adulte de Rat (Carouge et coll., 2010). Nous avons donc cherché à savoir si la régulation du gène *PP1C β* par la cocaïne mettait en jeu un mécanisme dépendant de la méthylation de l’ADN et de MeCP2.

Du fait de son rôle dans les phénomènes de plasticité cérébrale, PP1 est également impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Genoux et coll., 2002 ; pour revue : Munton et coll., 2004). Nous avons de ce fait évalué la régulation du gène *PP1C β* par la cocaïne dans un test de conditionnement opérant, l'AA de cocaïne. Pour ce faire, nous avons comparé les effets du conditionnement opérant à la cocaïne sur l'expression du gène *PP1C β* , à ceux d'une administration passive de cocaïne, afin de mettre en évidence une éventuelle régulation différentielle de l'expression de ce gène, et de dégager ainsi le rôle de PP1 dans les processus mnésiques en lien avec la cocaïne.

Il est largement établi que le système de récompense est à la fois activé par les drogues et les récompenses naturelles. Il a néanmoins été montré que des neuroadaptations plus spécifiques sont induites par chacun de ces types de renforçateurs (Carelli et coll., 2000 ; Levy et coll., 2007 ; Chen et coll., 2008). Nous nous sommes donc demandés si l'expression du gène *PP1C β* pouvait être régulée différemment par la cocaïne et la nourriture. Si tel est le cas, *PP1C β* serait alors susceptible de participer aux neuroadaptations différentielles induites par les drogues et les récompenses naturelles.

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

ARTICLE 1

Depuis ces dernières années, différentes études ont montré que la prise répétée de cocaïne induit des modifications épigénétiques, et que celles-ci sont impliquées dans les effets comportementaux de la cocaïne (pour revues : Maze et Nestler, 2011 ; Robison et Nestler, 2011). Notre équipe a notamment mis en évidence que divers facteurs épigénétiques, dont des protéines de liaison à l'ADN méthylé comme MeCP2 et des HDAC comme HDAC2, étaient induits en réponse à un traitement chronique par la cocaïne, suggérant des modifications de l'expression de certains gènes liées à la méthylation de l'ADN (Cassel et coll., 2006 ; Host et coll., 2011). Ceci a été confirmé par le fait que notre équipe a démontré que la cocaïne était en effet capable de modifier le profil de méthylation de gènes dans le cerveau de Rat, à l'âge adulte (Carouge et coll., 2010). Des données antérieures de notre équipe obtenues par la technique des 'microarrays' ont permis d'identifier 147 gènes différentiellement régulés par la cocaïne, dont le gène *PP1C β* codant la sous-unité catalytique β de PP1. Cette protéine étant fortement impliquée dans les processus de plasticité synaptique et structurale (pour revues : Ceulemans et Bollen, 2004 ; Munton et coll., 2004), elle est de ce fait susceptible de participer aux effets à long-terme de la cocaïne.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation de l'expression du gène *PP1C β* par la cocaïne. L'analyse de la région 5' promotrice du gène ayant révélé la présence d'un îlot CpG, nous nous sommes posés la question de savoir si l'expression du gène *PP1C β* était liée à un mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN et de MeCP2.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps utilisé des cultures de cellules PC12, que nous avons traitées avec un agent déméthylant, la 5-aza-2'-déoxycytidine (Daza). L'expression du gène *PP1C β* était fortement induite par ce type de traitement. Ayant par ailleurs démontré le recrutement de MeCP2 au niveau de la région 5' promotrice du gène *PP1C β* dans les cellules PC12, nos données indiquent une régulation de l'expression de ce gène par méthylation de l'ADN. La régulation de la transcription du gène *PP1C β* par MeCP2 a également été confirmée par le fait qu'un traitement à la 5-HT, qui induit une augmentation des taux de MeCP2 (Cassel et coll., 2006), était associé à une répression du gène *PP1C β* dans les cellules PC12. Toujours en accord avec une régulation de la transcription de *PP1C β* par MeCP2, une augmentation de l'expression de *PP1C β* a été

observée dans les structures cérébrales de souris *Mecp2*^{308/Y}, ces souris présentant une protéine *Mecp2* tronquée, ne possédant pas certains domaines en C-terminal impliqués dans la compaction des nucléosomes (Ghosh et coll., 2010). De manière intéressante, l'expression d'une autre sous-unité catalytique de PP1, *PP1C α* , n'était modulée ni par un traitement par la Daza, ni dans les structures cérébrales des souris *Mecp2*^{308/Y}. Pourtant, les gènes *PP1C α* et *PP1C β* présentent une forte homologie de séquence, les seules variabilités observées étant localisées dans les extrémités 5' et 3' terminales, et chacun de ces deux gènes présente un îlot CpG dans sa région 5' promotrice. Nos données indiquent donc que la présence d'un îlot CpG n'est pas une condition suffisante pour qu'un gène soit régulé par méthylation, en accord avec le fait qu'en conditions non-pathologiques, la majorité des îlots CpG est non-méthylée (pour revue : Deaton et Bird, 2011).

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement à la régulation de l'expression du gène *PP1C β* par la cocaïne. Nous avons montré qu'un traitement chronique par la cocaïne induisait une augmentation de l'expression des *DNMT3A* et *3B*, responsables de la méthylation *de novo*, dans le CxPF et le CPu de rats. En accord avec cette augmentation, nous avons observé une augmentation de la méthylation de la région 5' promotrice du gène *PP1C β* , associée à un recrutement accru de *Mecp2* au niveau de cette même région, dans le striatum de rats traités par la cocaïne pendant 10 jours. Nous avons par ailleurs observé une répression de *PP1C β* , suite à un traitement chronique par la cocaïne, tant au niveau de l'ARN que de la protéine, confirmant le rôle de MeCP2 en tant que répresseur de la transcription. Au contraire, aucun changement de l'expression du gène *PP1C α* n'a été observé en réponse à la cocaïne.

Nos données indiquent que la prise chronique de cocaïne induit une répression du gène *PP1C β* via un mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN et de MeCP2. Cette répression pourrait notamment favoriser la voie de la PKA issue de l'activation des récepteurs D1 de la DA, et potentialiser ainsi les effets de la cocaïne. PP1 étant impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire, au sein desquels elle joue un rôle de régulateur négatif (Genoux et coll., 2002 ; Miller et Sweatt, 2007 ; pour revue : Munton et coll., 2004), la répression de *PP1C β* par la cocaïne pourrait également permettre une meilleure 'mémorisation' des souvenirs et du contexte liés à la drogue, et participer au développement et au maintien des habitudes induites par la consommation répétée de cocaïne.

Nos résultats suggèrent par ailleurs que les différentes sous-unités catalytiques de PP1 ne seraient pas impliquées dans les mêmes processus, mais qu'elles joueraient plutôt des rôles particuliers au sein de la biologie cellulaire, notamment grâce à leur spécificité de localisation et de régulation. Il semble donc important de définir la nature et l'implication des sous-unités catalytiques de PP1 mises en jeu dans les processus cellulaires étudiés.

Cocaine represses Protein Phosphatase-1C β through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain

**Sarah Pol Bodetto, Delphine Carouge[#], Jean-Bernard Dietrich,
Jean Zwiller and Patrick Anglard^{*}**

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237
CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

* Corresponding author: P. Anglard, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
Tel.: 33 3 68 85 53 80
FAX: 33 3 68 85 19 58
E-mail: anglard@neuro-cnrs.unistra.fr

Present address: Institute for Systems Biology, Seattle, WA, USA

Abbreviations:

ChIP, chromatin immunoprecipitation; CPu, caudate putamen; CREB, cAMP response element-binding protein; DARPP-32, dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein; DNMT, DNA methyltransferase; MBDs, Methyl-CpG-Binding Domain proteins; Mecp2, Methyl-CpG Binding Protein-2; MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation; NAc, nucleus accumbens; PFCx, prefrontal cortex; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PP1C, protein phosphatase type-1 catalytic subunit; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR.

ABSTRACT

Repeated cocaine exposure is associated with the induction of epigenetic factors such as methyl-binding proteins, suggesting that resulting changes in gene expression are mediated by alterations in brain DNA methylation. Mutations in Methyl-CpG Binding Protein-2 (MeCP2) account for Rett syndrome, a leading cause of mental retardation in females and its mutation in mice produce deficits in spatial memory and in contextual and cued fear conditioning memory. By looking for genes modulated by cocaine, we identified the protein phosphatase type-1 catalytic subunit *PP1C β* gene, involved in synaptic plasticity and known as a memory suppressor. In PC12 cells, *PP1C β* was strongly induced by the pharmacological inhibition of DNA methyltransferases (DNMTs) and was bound to Mecp2, suggesting a DNA methylation-dependent regulation. Accordingly, *PP1C β* expression was repressed in these cells by serotonin-induced Mecp2 levels and was increased in the brain of Mecp2^{308/Y} mutant mice. Chronic cocaine treatment was found to increase both the methylation of *PP1C β* gene and its binding to Mecp2 in rat striatum, consistent with an increase in *DNMT3A* and *3B* expression. These changes resulted in *PP1C β* mRNA and protein repression in rat striatum and prefrontal cortex, as observed by RT-qPCR, immunohistochemistry and Western blotting. Our data show that *PP1C β* regulation differs from that of *PP1C α* and demonstrate that *PP1C β* is a direct Mecp2-target gene repressed by cocaine through DNA methylation. They also provide a link between two genes involved in learning and memory processes. Methylation of *PP1C β* may therefore participate in long lasting changes triggered by cocaine, such as drug dependence.

Keywords: DNA methylation, cocaine, protein phosphatase-1, MeCP2, epigenetics, drugs of abuse

1. Introduction

Acute and repeated cocaine exposures have been shown to induce changes in the expression of many genes in various brain structures (Robison and Nestler, 2011). Such transcriptional modifications can be rapid and transient, but can also be persistent and therefore account for long term behavioral changes following repeated exposure. Drug-induced behaviors have been attributed at least in part to epigenetic mechanisms that represent attractive candidates to explain long lasting behaviors, such as relapse after long periods of abstinence (Colvis et al., 2005; Graff et al., 2011). However, while histone post-translational modifications by cocaine have been well documented, only recently has it been shown that cocaine also acts on DNA methylation involving Methyl-CpG-Binding Domain proteins (MBDs) and DNA methyltransferases (DNMTs).

DNA methylation is considered as a stable covalent modification inherited upon mitosis in adult cells and involves the transfer of a methyl group to the 5' position of cytosine in CpG sites. CpG sites tend to cluster in regions of high CpG density called CpG islands (CGI) often associated with the promoters of housekeeping and tissue specific genes (Antequera and Bird, 1993; Deaton and Bird, 2011). In normal tissue, although most tissue-specific DNA methylation occurs in 'CGI shores' (Irizarry et al., 2009), most of these regions are usually unmethylated allowing transcription. In contrast, CpG at other locations such as in intronic and repetitive DNA elements are typically hypermethylated, preventing transcription (Portela and Esteller, 2010). Traditionally, DNA methylation in gene promoters is associated with transcriptional repression by preventing the binding of transcription factors to their cognate sites and/or by recruiting methyl-cytosine recognizing proteins such as MBD1, MBD2 or Methyl-CpG Binding Protein-2 (MeCP2), which possess repressive chromatin-remodeling activity (Deaton and Bird, 2011). Deviations from the normal DNA methylation pattern have been reported to contribute to aging-related diseases such as cancer and cardiovascular diseases, but have also been observed in response to certain dietary components or drugs of abuse such as alcohol and nicotine. However, their relevance to brain diseases other than cancer is poorly documented and only a limited number of genes have been identified as modulated by DNA methylation in response to environmental factors and drugs of abuse.

We have previously shown that cocaine and fluoxetine influence chromatin remodeling *via* methyl-CpG-binding proteins and act through mechanisms involving DNA methylation (Cassel et al., 2006). By showing that the *CDKL5* gene is repressed by cocaine in

rat striatum through a Mecp2-mediated mechanism involving hypermethylation of its 5'-flanking sequence (Carouge et al., 2010), we have provided the first evidence for the effect of a pharmacological agent to be able to modify DNA methylation in mature brain. Thereafter, the striatal Mecp2 knockdown was reported to decrease cocaine intake (Im et al., 2010). Mecp2^{308/Y} mice expressing a C-terminal truncation of the protein, were found to exhibit reduced locomotor sensitization and conditioned place preference in response to repeated administration of amphetamine (Deng et al., 2010). Interestingly, overexpression of DNMT3A in the nucleus accumbens (NAc) reduced cocaine place preference and enhanced depression-like behavior, whereas DNMT3A knockdown enhanced cocaine place preference and had anti-depressive effects, suggesting that DNMT3A mediates both cocaine- and stress-induced behavioral changes (LaPlant et al., 2010). In addition, injections of DNMT inhibitors in brain structures involved in learning and memory processes have revealed a role of DNA methylation in both the acquisition and expression of cocaine-induced place preference (Han et al., 2010).

By using microarrays, we have identified the β catalytic subunit of the protein phosphatase type-1 gene (*PP1C β*) as being repressed by chronic cocaine treatment. PP1 is highly expressed in the brain and its contribution to synaptic and structural plasticity is well documented (Genoux et al., 2011; Haegel et al., 2010; Strack et al., 1999). Since repeated cocaine exposure induces brain plasticity, PP1C β was an attractive candidate to participate in cocaine long term effects. We therefore investigated in the present study whether cocaine modulates the expression of PP1C β through a Mecp2-mediated mechanism. To this end, PP1C β expression was analyzed in various brain structures related to the reward system in response to acute and chronic cocaine treatment by qPCR, immunohistochemistry and Western blot. The contribution of DNA methylation in the regulation of the different PP1C isoforms expression was addressed using DNMT inhibitors and Mecp2^{308/Y} mice. The expression of DNMTs, the methylation of *PP1C β* gene 5'-end and its binding to Mecp2 were also investigated *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (Janvier, France), 8 to 9 weeks old at their arrival in the laboratory, were housed in standard home cages in temperature- and humidity-controlled rooms with a 12 h / 12 h light/dark cycle (lights on at 7.00 am). Animals had access to food and water *ad libitum*. They were allowed to acclimate to laboratory conditions and were handled at least one week before experimental procedures. They were then intraperitoneally (i.p.) injected either once or repeatedly (1 injection per day) for 10 days with either 20 mg/kg cocaine hydrochloride (Cooper, Melun, France) or an equivalent volume of saline (0.9% NaCl). *Mecp2*^{308/Y} and *Mecp2*^{X/Y} males were from breeding pairs of *Mecp2*-308 mice backcrossed to C57BL/6J mice. Original mice were from Jackson Laboratories (B6-129S-*Mecp2*tm1Hzo/J, stock number: 005439, USA). 13 weeks-old mice were killed by cervical dislocation and their brain was dissected. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies (Council directive 87848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection animale, permission 67-165 to JZ).

2.2. Cell culture

Rat pheochromocytoma PC12 cells were grown, as previously described (Carouge et al., 2010). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Stock solution of 20 mM 5-aza-2'-deoxycytidine (Daza) was made in DMSO and stored at -80°C. Daza was added to exponentially growing cells at time 0, 24 and 48 h; cells were harvested after 1 or 3 days. For treatment with serotonin (5-HT), the serum concentration of the culture medium was reduced to 1% and 5-HT or vehicle was added to the culture medium every day for 2 days. Total RNA was extracted and RT-qPCR was performed, as previously described (Cassel et al., 2006).

2.3. Reverse Transcription-quantitative PCR Analysis

Animals were sacrificed 5 h, 10 h or 15 h after the last i.p. injection and brain structures of interest were dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). RNA was extracted (Ludwig et al., 2000) from rat medial prefrontal cortex and caudate putamen (CPu) and first strand cDNA was generated from 0.5 µg of total RNA using random primers and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was performed as previously described (Carouge et al., 2010). Primers for rat and mouse genes were from Sigma-Aldrich Co. and are

listed in Table 1. Primers were designed with Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) used under stringent conditions and amplicons were selected to span exon borders to exclude false positive detection of genomic contaminations. Results were normalized to 36B4 used as an internal control. Cycling conditions were: 95°C for 14 min, then 40 cycles of 95°C for 14 s, 60°C for 18 s and 72°C for 18 s. The specificity of each PCR product was verified by melting curve analysis and confirmed by 2% agarose gel electrophoresis. Real time PCR was conducted three times for each gene of interest, with samples in triplicates.

2.4. Methylated DNA Immunoprecipitation Assay

Animals were sacrificed 12 h after the last i.p. injection and striatum was dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) was performed using MethylampTM Methylated DNA Capture Kit (Epigentek Group, Brooklyn, NY). Genomic DNA was extracted from rat striatum and 0.5 µg DNA aliquots were sheared by sonication in 150 µl (Vibra^m CellTM 75041, Bioblock Scientific) with 3 cycles of 12 s ON, 40 s OFF at 22% power. Sonicated fragments ranging from 200 bp to 1000 bp were divided into immunoprecipitated (IP) and input (Inp) portions. IP DNA was incubated with anti-5-methylcytosine antibody and the negative control was normal mouse IgG. The DNA fragments recovered were then used as templates for real time PCR using *PP1Cβ* FS2 R3 primers (Table 1), generating a 139 bp PCR fragment. Cycling conditions were: 95°C for 15 min, then 60 cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 20 s and 72°C for 20 s. The specificity of the PCR product was verified by melting curve analysis and by 2% agarose gel electrophoresis. Real time PCR was conducted three times, with samples in duplicates. Relative enrichment of the target *PP1Cβ* sequence after MeDIP was estimated as the ratio of the signal in IP DNA divided by that in Inp DNA.

2.5. Chromatin Immunoprecipitation Assay

Animals were sacrificed 12 h after the last injection and striatum was dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). Cross-linking proteins to genomic DNA and ChIP assay have been essentially performed as described with an antibody raised against Mecp2 (Carouge et al., 2010; Huang et al., 2006). Real time PCR was carried out using three different sets of primers for *PP1Cβ* (FS2 R3, FEx1S1 REx1R5 and FEx1S4 REx1R3; Table 1) and one set of primers for *Cdkl5* (FS2 R2; Table 1), as a positive control. Cycling conditions were: 95°C for 15 min, then 50 cycles of 95°C for 15 s, 58-62°C (depending on the primers) for 20 s and

72°C for 20 s. Single PCR products were verified both by assessing their melting temperature and by viewing them on agarose gel. Real time PCR was conducted three times. Immunoprecipitated DNA was calculated by first subtracting the amount of sequence present in the no antibody background control from the amount present in the immunoprecipitated DNA and then dividing by the amount of sequence in the diluted input material.

2.6. Immunohistochemistry

Four hours, 12 h or 20 h after the last i.p. injection, rats were sacrificed by an overdose of pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 100 ml saline followed by 1% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, 250 ml). The brains were postfixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 1 h before being kept overnight at 4°C in 15% sucrose, then frozen in isopentane at -40°C, and finally stored at -80°C. Coronal tissue sections (16 µm thick) were prepared using a Microm HM560 S_18 Cryostat. Immunohistochemistry was carried out as described previously (Cassel et al., 2006). Antibody incubation was performed overnight with a purified rabbit polyclonal antibody against PP1Cβ (Millipore) diluted 1:50 in horse serum. The PP1Cβ antibody was raised against the purified peptide (PRTANPPKKR, amino acids 318-327) corresponding to the C-terminus of PP1Cβ catalytic subunit (Strack et al., 1999). For each experimental condition, the number of PP1Cβ immunoreactive cells in the prefrontal cortex (anterior cingulate cortex), in the CPu and in the nucleus accumbens (core and shell) was determined using the Image J processing software. The number of PP1Cβ immunoreactive cells was counted bilaterally on four consecutive sections per rat. Counting was made twice by an investigator blinded to the identity of the samples.

2.7. Western blot analysis of PP1Cβ in the caudate putamen

SDS-PAGE of CPu homogenate and immunoblotting were performed as previously described (Carouge et al., 2010). Antibody incubation was performed overnight with the anti-PP1Cβ antibody (Millipore) diluted 1:200 or with a goat anti-α-tubulin antibody (SantaCruz Biotechnol., Inc. CA) diluted 1:100 in blocking buffer. Blots were washed five times in 0.05% (v/v) Tween-20 in TBS and then incubated for 1 h at room temperature in secondary donkey anti-goat peroxidase-conjugated antibody or secondary donkey anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody diluted 1:25,000 in blocking buffer. The detection was carried out using the chemiluminescence method (Pierce, Rockford, IL) with 1- to 10 min exposure to Kodak Biomax MR autoradiographic film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by standard two-tailed Student's *t*-test and by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test, when requested. Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Transcription of PP1 catalytic subunit isoforms in response to DNMT inhibition

We first measured the expression of the genes encoding the PP1 α and β catalytic subunits in response to the DNMT inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (Daza) in rat PC12 neuroendocrine cells (Fig. 1). Incorporation of the deoxycytidine analog into replicating DNA inhibits DNMT activity resulting in DNA hypomethylation (Egger et al., 2004). PC12 cells were exposed to either 2 or 10 μ M of Daza for 1 or 3 days, conditions known to demethylate DNA. The expression of *PP1C α* and *PP1C β* genes was evaluated by real time RT-PCR. A striking increase in *PP1C β* expression ranging from 2- to 5.5-fold was observed in response to DNMT inhibition (t-test, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). In contrast, *PP1C α* was not affected by the same treatment and *PP1C γ* expression could not be detected in the cells. *PP1C β* therefore appeared to be regulated by DNA methylation, whereas *PP1C α* was probably not. The level of *Mecp2* expression was also evaluated and was found to be strongly induced in response to Daza with a magnitude ranging from 2- to about 9-fold (t-test, $p < 0.01$). It appears that *Mecp2* is also regulated by DNA methylation, in agreement with previous data reporting that increase in its methylation was associated with a low expression in autistic brains (Nagarajan et al., 2006). The *reelin* gene was used as a positive control, since its regulation by DNA methylation is well documented (Kundakovic et al., 2007); an increase of about 40-fold in its expression was observed following 10 μ M Daza treatment for 3 days (t-test, $p < 0.01$).

3.2. Differential regulation of *PP1C α* and *PP1C β* gene expression by serotonin

Since we found that both cocaine and fluoxetine induced *Mecp2* and *Mbd1* proteins (Cassel et al., 2006), serotonin was likely involved in this process. We therefore examined whether *PP1C α* and *PP1C β* expression could be directly modulated by serotonin. As illustrated in figure 2, the expression of *PP1C α* was significantly induced by serotonin with a 2.3- to 2.8-fold increase (t-test, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). In contrast, a striking 10-fold decrease was observed in *PP1C β* expression in response to serotonin (t-test, $p < 0.05$). Since serotonin-elevating agents induce *Mecp2* expression in both PC12 cells (Carouge et al., 2010) and *in vivo* (Cassel et al., 2006; Im et al., 2010), the repression of *PP1C β* by serotonin further suggests that *PP1C β* is regulated by DNA methylation.

3.3. Mecp2 binds to *PP1Cβ* gene and Mecp2^{308/Y} mice display enhanced levels of *PP1Cβ*

Whether Mecp2 binds to the *PP1Cβ* gene was next addressed by chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) performed in PC12 cells (Fig. 3A). Chromatin was prepared from cultured cells and incubated with an antibody directed against Mecp2. Following IP, recovered DNA fragments were used as templates for PCR employing primer sets corresponding to the 5'-end of *PP1Cβ* and *Cdkl5* genes, the later being used as a positive control (Carouge et al., 2010). An enrichment resulting from Mecp2 binding to *PP1Cβ* sequence was found, which was not observed in the absence of Mecp2 antibody. The binding represents a specific association of Mecp2 with *PP1Cβ* because IgG failed to immunoprecipitate *PP1Cβ* 5'-end sequences. In addition, this binding requires methylated DNA, since it was not observed, as expected, when chromatin was prepared from cells exposed to 10 μM Daza (Suppl. Fig. S1). The presence of Mecp2 near the transcription start site of *PP1Cβ* may control its transcription by altering the binding of transcription factors to their cognate elements or by reducing the efficiency of RNA polymerase II.

The contribution of Mecp2 in the regulation of *PP1Cβ* expression was further addressed in Mecp2^{308/Y} mice by evaluating its expression relative to that of other PP1C isoforms. Since symptoms onset in these mice only occur after 6-12 weeks of age (Shahbazian et al., 2002), we looked for *PP1Cα*, *β* and *γ* expression in two dopaminergic projection areas of 13 weeks-old Mecp2^{308/Y} mice and their Mecp2^{X/Y} littermates (Fig. 3). In the striatum of Mecp2^{308/Y} mice (Fig. 3B), the levels of *PP1Cβ* and *γ* were higher than in their wild type counterparts ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively), whereas no significant difference was observed between genotypes for the *PP1Cα* transcript. The levels of *PP1Cβ* were also higher in the prefrontal cortex (PFCx) of Mecp2^{308/Y} mice (Fig. 3C, $p < 0.01$), whereas the low expression of *PP1Cγ* previously described (Strack et al., 1999) could not be evaluated. There was no difference in the levels of *PP1Cα* between genotypes in the PFCx. Overall, the transcription of the three PP1C isoforms observed in Mecp2^{308/Y} mice and their Mecp2^{X/Y} littermates was consistent with their expression in response to DNMT inhibition (Fig. 1) and with the binding of Mecp2 to *PP1Cβ* in PC12 cells (Fig. 3A). *PP1Cβ* and *γ* appear to be regulated by a mechanism involving DNA methylation and Mecp2, whereas *PP1Cα* is not.

3.4. DNA methyltransferases are differentially regulated by cocaine in the CPu and the PFCx

DNMTs have recently been reported to be modulated by cocaine in the NAc in which their expression or activity has been involved in cocaine place preference, cocaine reward and dendritic spine formation (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010). Since *PP1C β* was found to be induced by DNMT inhibition in PC12 cells (Fig. 1), we next investigated whether the expression of *DNMTs* was modulated by repeated cocaine treatment. The time course of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* mRNA was therefore studied by RT-qPCR in the CPu and the medial part of the PFCx at 5, 10 and 15 h after the last injection (Fig. 4). *DNMT1* mRNA level remained unchanged in the CPu, whereas *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were dynamically regulated after cocaine treatment. A 1.5-fold increase in *DNMT3A* mRNA level was observed 10 h after the last cocaine injection ($p < 0.05$) followed by a 50% decrease 15 h after the last cocaine injection ($p < 0.05$). The time course of *DNMT3B* was quite different with a transient 1.5-fold increase observed 5 h after the last cocaine injection ($p < 0.05$). In the PFCx, *DNMT1* mRNA level was not significantly affected by cocaine, whereas *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were increased 3-fold ($p < 0.01$) and 2.3-fold ($p < 0.05$) 15 h after the last cocaine injection, respectively.

3.5. *PP1C β* promoter region is hypermethylated after chronic cocaine treatment

Since chronic cocaine treatment induced *DNMT3A* and *3B* expression, we next analyzed the DNA methylation status of the *PP1C β* gene. Analysis of the *PP1C β* 5'-end sequence revealed a CGI of 890 bp lying 369 bp upstream to 521 bp downstream to the transcription start site (Fig. 5A). Part of this sequence including the transcription and the translation start sites was found to be homologous (>83%) to its human and mouse counterparts (Suppl. Fig. S2) with conserved CpG positions. Methylation of the CGI containing sequence was evaluated by methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) assay using DNA extracted from rat CPu. Sonicated DNA fragments ranging from 0.2 to 1 kb were precipitated with an antibody directed against 5-methylcytosine and recovered fragments were used as templates for real time PCR with primers located within the CGI. The *PP1C β* 5'-end was found to be methylated in the CPu of control rats, as illustrated by a specific PCR product that was not observed when the 5-methylcytosine antibody was replaced by IgG or in the absence of the antibody (Fig. 5B&C). Chronic cocaine treatment resulted in a 3.4-fold increase in *PP1C β*

methylation 12 h after the last injection ($p < 0.05$). The data are therefore consistent with the induction of *DNMT* expression by chronic cocaine treatment.

3.6. Mecp2 binding to methylated *PP1Cβ* is increased by cocaine in rat CPu

Since *PP1Cβ* methylation was increased by chronic cocaine treatment in the CPu (Fig. 5B&C), Mecp2 binding to *PP1Cβ* was next addressed in the same brain structure by ChIP assay. Chromatin (sonicated to DNA fragments ranging from 0.3 to 1.2 kb) was prepared from rat CPu and ChIP was performed with an antibody directed against Mecp2. DNA fragments recovered were extracted and analyzed by qPCR employing *PP1Cβ* primer sets (Fig. 6A, Table 1). While Mecp2 binding was not significantly affected by a single cocaine injection, a 50% increase was observed following the chronic treatment (Fig. 6B&C; $p < 0.05$). No binding was observed in the absence of Mecp2 antibody and IgG failed to immunoprecipitate *PP1Cβ* sequences (Fig. 6C). Thus, the binding of Mecp2 to the *PP1Cβ* gene which was observed in PC12 cells (Fig. 3A) also occurred in rat CPu. The increase in response to repeated cocaine exposure is consistent with both chronic cocaine-induced *PP1Cβ* methylation and chronic cocaine-induced Mecp2 levels (Cassel et al., 2006).

3.7. *PP1Cβ* gene is repressed by chronic cocaine treatment in the CPu and the PFCx

Considering that Mecp2 binding to the methylated *PP1Cβ* gene was increased by cocaine, the time course of *PP1Cβ* mRNA level was next investigated by RT-qPCR in the CPu and the PFCx after chronic cocaine treatment. As shown in figure 7, *PP1Cβ* mRNA level was reduced, the effect being maximal 15 h after the last cocaine injection. In the CPu and in the PFCx, the reduction reached about 50% ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). In contrast, the expression of *PP1Cα* was not affected by cocaine treatment, neither in the CPu, nor in the PFCx. The decrease in *PP1Cβ* mRNA levels is therefore likely to result from the binding of Mecp2 to the methylated *PP1Cβ* 5'-end and is consistent with the role of MeCP2 acting as a transcriptional repressor.

3.8. *PP1Cβ* protein is down-regulated by cocaine in the PFCx, the CPu and the NAc

We finally measured *PP1Cβ* protein expression in response to cocaine using immunohistochemistry. Chronic cocaine treatment was found to reduce the number of *PP1Cβ* immunopositive cells in the PFCx (Fig. 8A) and the CPu (Fig. 8B) 12 h after the last injection. The effect was similar in different structures examined (Fig. 8C), as we observed a

63% decrease in the anterior cingulate cortex (PFCx) (* different from the chronic NaCl group, $p < 0.01$; # different from the acute cocaine group, $p < 0.01$), a 55% decrease in the dorsolateral CPu (* different from the chronic NaCl group, $p < 0.01$; # different from the acute cocaine group, $p < 0.005$), a 47% decrease in the NAc core (* different from the chronic NaCl group, $p < 0.01$; # different from the acute cocaine group, $p < 0.005$) and a 46% decrease in the NAc shell (* different from the chronic NaCl group, $p < 0.005$; # different from the acute cocaine group, $p < 0.001$). No effect in PP1C β protein expression was observed 12 h after a single cocaine injection in the brain structures examined (Fig. 8C). Interestingly, the time course of PP1C β protein expression 4 h, 12 h and 20 h after acute and chronic cocaine treatment revealed a dynamic time-related regulation by cocaine (Fig. 8D). Indeed, acute cocaine treatment did not affect the number of PP1C β positive cells in the dorsolateral CPu, while chronic cocaine-induced PP1C β repression only appeared 12 h after the last cocaine injection (** different from the chronic NaCl group 12 h, $p < 0.01$) and was still observed 20 h after the injection (* different from the chronic NaCl group 20 h, $p < 0.05$). PP1C β levels were further analyzed by Western blot in the CPu 12 h after acute and chronic cocaine treatment (Fig. 8E). PP1C β protein of the expected apparent molecular weight of about 38 k was found to be significantly reduced in response to chronic cocaine treatment, but was not affected by acute treatment, further supporting the decrease in PP1C β positive cells only observed in this brain structure following repeated cocaine exposure. PP1C β protein levels therefore appear consistent with those of *PP1C β* mRNA and further support the transcriptional repression of *PP1C β* by chronic cocaine treatment.

4. Discussion

In the present study we demonstrate that cocaine represses *PP1C β* expression through DNA methylation and MeCP2 recruitment. In PC12 cells, its expression was found to be induced by DNMT inhibition and repressed by 5-HT, whereas *PP1C α* expression was not affected by DNMT inhibition and was induced by 5-HT. The differential regulation between *PP1C* isoforms was further illustrated by showing that *Mecp2*^{308/Y} mutant mice displayed enhanced levels of *PP1C β* and *PP1C γ* expression, but not of *PP1C α* expression. Chronic cocaine treatment was found to upregulate *DNMT3A* and *3B* mRNA, to increase the methylation of the *PP1C β* gene as well as *Mecp2* binding to it. This finally resulted in the down-regulation of *PP1C β* mRNA and protein in rat striatum and prefrontal cortex, demonstrating that *PP1C β* is an additional direct *Mecp2*-target gene. Taken together, our data suggest that *PP1C β* repression by DNA methylation contributes to neural and behavioral adaptations triggered by cocaine.

The type-1 protein phosphatases are encoded by three highly related catalytic subunit genes (*PP1C α* , *PP1C β/δ* and *PP1C γ*), and alternative splicing generates the γ 1 and γ 2 isoforms. PP1 are multimeric holoenzymes containing one of the four *PP1C* isoforms sharing nearly 90% amino acid sequence identity (Luo et al., 2007) that associate with a host of divergent regulatory or targeting subunits (Bollen and Stalmans, 1992; Hubbard and Cohen, 1993; Moorhead et al., 2007; Virshup and Shenolikar, 2009). To some extent, *PP1C* subunits exhibit a differential cellular and subcellular localization (Bordelon et al., 2005; da Cruz e Silva et al., 1995). In the brain, *PP1C α* and γ 1 are highly enriched in dendritic spines through their association with spinophilin and neurabin (Allen et al., 1997; Nakanishi et al., 1997), whereas *PP1C β* is particularly enriched in the periphery of the soma, its immunoreactivity being interrupted by bundles of microtubules extending into major dendrites (Strack et al., 1999). All isoforms are also present within the nucleus in which their localization pattern changes both throughout the cell cycle and in response to cellular perturbations (Moorhead et al., 2007). In the nucleus, PP1 has been shown to participate to chromosome architecture in chicken lymphocytes (Vagnarelli et al., 2006) and to be required for appropriate H3S10 dephosphorylation, H3K9 methylation and DNA methylation in *Neurospora* (Adhvaryu and Selker, 2008). The selective inhibition of the nuclear pool of PP1 in forebrain neurons has also been shown to induce histone post-translational modifications and to be correlated with long-term memory improvement, indicating a role of PP1 in the epigenetic control of gene transcription (Koshibu et al., 2009). Interestingly, even if all isoforms are present in the

nucleus, they display specific localization patterns. PP1C α shows a diffuse distribution and associates with the nuclear matrix, PP1C β localizes to whole chromatin and associates with chromosomes, while PP1C γ concentrates in nucleoli and associates with microtubules of the mitotic spindle (Andreassen et al., 1998; Lesage et al., 2005; Moorhead et al., 2007). Thus, the distinct localization patterns observed in both the cytoplasm and the nucleus allow independent roles for each isoform in regulating cellular processes. However, most studies have highlighted indirectly the different roles of PP1 in the brain, by using or manipulating endogenous PP1 inhibitors such as DARPP-32 (dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein) or Inhibitor-1 (I-1), or by using okadaic acid that do not discriminate between PP1C isoforms.

Our data show that PP1C β is repressed by cocaine in the CPu, the PFCx, the NAc, as well as by 5-HT in PC12 cells. In contrast, PP1C α was not affected by cocaine *in vivo*, although it was induced by 5-HT in PC12 cells. Since cocaine inhibits the reuptake of monoamines, the repression of PP1C β by 5-HT in cells in which Mecp2 is induced (Carouge et al., 2010), suggests that 5-HT plays an important role in mediating the *in vivo* repression of PP1C β and possibly PP1C γ (Anier et al., 2010) by cocaine, consistent with our previous data underlining the serotonergic system as predominantly involved in modulating Mecp2 expression by cocaine (Cassel et al., 2006).

DNA methylation is recognized as a gene silencing signal that usually ensures the long-term shutdown of gene expression (Klose and Bird, 2003). Accordingly, DNA methylation in eukaryotes is a common feature of heterochromatin that is typically highly condensed, gene poor and transcriptionally silent (Tamaru, 2010). Considering PP1 involvement in structural and synaptic plasticity, the Mecp2-mediated repression of PP1C β by cocaine that we observed appears to be interesting. Indeed, DNA methylation remains an attractive mechanism to play a role in long lasting gene expression changes, such as those associated with memory storage and drug-induced behavior. In the PFCx, long lasting DNA methylation of the memory suppressor gene calcineurin (PP2B) has been shown to be required for remote memory retrieval, 30 days after contextual fear conditioning (Miller et al., 2010). Interestingly, dynamic DNA methylation seems to be also involved in learning and memory processes, since contextual fear conditioning induces a transient PP1C β gene methylation resulting to its transient repression in the hippocampus that can be blocked, as memory formation, by DNMT inhibition (Miller and Sweatt, 2007).

More recently, DNA methylation and DNMTs have also been reported to be required in drugs of abuse-associated memories. In the hippocampus, DNMT inhibition leads to learning impairments in cocaine-conditioned place preference, whereas in the PFCx, this inhibition alters the retrieval of cocaine-induced place preference (Han et al., 2010). DNMT inhibition in the NAc was also recently reported to decrease cocaine behavioral sensitization, illustrating another role of DNMTs in cocaine-induced behavior (Anier et al., 2010). The methylation of *PP1C β* 5'-end we observed after chronic cocaine treatment (Fig. 5) was correlated with the induction of *DNMT3A* and *3B* expression that are required for *de novo* methylation, whereas no significant change was observed in the expression of *DNMT1* that is essential for maintaining DNA methylation patterns (Goll and Bestor, 2005). Consistent with few recent reports (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010), the time course of *DNMT3A* and *3B* was different at several times after the last injection, indicating that the expression of *DNMTs* in the brain is regulated by distinct mechanisms. It also suggests that each daily cocaine injection results in the transient induction of DNMTs and that those successive pulses of expression may probably lead to progressive DNA methylation. Accordingly, gene repression may progressively occur after a critical number of methylation waves, thereby explaining why *PP1C β* repression is only observed after chronic cocaine treatment.

It therefore does not seem surprising that the role of DNA methylation in memory- and drug-induced brain changes has also been documented in several studies involving different MBD. On one hand, the loss of MBD1 leads to autism-like behavioral deficits (Allan et al., 2008) and its expression is induced, as that of *Mecp2*, by fluoxetine and cocaine in adult rat brain (Cassel et al., 2006). On the other hand, *MeCP2* mutations cause Rett syndrome (Amir et al., 1999) that is a leading cause of mental retardation and autistic behavior in females. Various aspects of Rett syndrome impairments have been recapitulated in animal models including deficits in spatial memory and learning (Moretti et al., 2006; Pelka et al., 2006). Deficits in hippocampal LTP and LTD have also been reported (Adachi et al., 2009; Asaka et al., 2006; Moretti et al., 2006), revealing a physiological correlate for impaired learning and memory in Rett syndrome. The mutant *Mecp2*^{308/Y} mice that recapitulate features of Rett syndrome (Moretti et al., 2006) exhibit a stronger *PP1C β* and *PP1C γ* expression. Although the cascade of molecular events triggered by *Mecp2* mutations leading to synaptic dysfunction and deficits in learning and memory is still poorly understood, histone H3 was initially found to be hyperacetylated in the cortex of *Mecp2*^{308/Y} mice (Shahbazian et al., 2002). This modification being generally associated with chromatin

decondensation and increased accessibility to binding proteins as well as with transcriptional activity, its involvement in controlling PP1C β and PP1C γ in these mice cannot be excluded. Conversely, we have previously reported a decrease in acetylated histone H3 in various brain structures in response to cocaine and fluoxetine (Cassel et al., 2006). Since MBD-methylated CpG complexes can recruit class I HDAC, the repression of PP1C β by cocaine we observed, as well as that of PP1C γ recently reported (Anier et al., 2010) could be mediated by HDAC recruitment. However, aside the potential role of histone modifications in PP1 expression, our data clearly demonstrate that PP1C β is a downstream target of both DNMTs and Mecp2 and that its repression is likely to result from DNA methylation and Mecp2 levels, because both are induced by cocaine.

Since PP1 plays multiple roles in chromatin remodeling, in learning and memory processes and in drug-induced behaviors, the repression of PP1C β raises the question of its functional significance in mediating cocaine responses. DARPP 32 KO mice (Hiroi et al., 1999; Zachariou et al., 2002), as well as Thr³⁴-DARPP 32 mutant mice (Zachariou et al., 2006) exhibiting higher PP1 activity, display increased locomotor sensitization, but decreased cocaine place preference, supporting the involvement of PP1 in cocaine behavioral effects. PP1 is known to dephosphorylate NR1 subunit of NMDA receptors (Flores-Hernandez et al., 2002; Snyder et al., 1998), GluR1 subunit of AMPA receptors (Yan et al., 1999), CaMKII and CREB (Genoux et al., 2002). PP1 down regulation by cocaine could therefore increase the phosphorylation state of these key regulation proteins involved in synaptic plasticity. Phosphorylation of CREB has been also correlated with enhanced learning and its repression of PP1 by cocaine could therefore participate in drug of abuse-associated memories. Indeed, the association between the drugs of abuse and their environmental or experimental aspects, has long been considered to be driven by classical Pavlovian learning (O'Brien et al., 1998) and addiction has been proposed to be a learning and memory disorder (Hyman, 2005). Animal studies have shown that repeated exposure to cocaine impairs spatial memory and cause transient deficits in attention (Muriach et al., 2010), whereas spatial memory was reported to be facilitated by post-training cocaine exposure (Iniguez et al., 2012). Repeated intraperitoneal cocaine administration facilitates retention of recent memory formation in cocaine-sensitized animals (Perez et al., 2010), whereas working memory deficits have been reported in rats trained to self-administer cocaine (Nic Dhonnchadha and Kantak, 2011). Thus, the effect of cocaine on memory appears to be different based on the type of memory considered and the mode or the period of drug administration. Moreover, repeated drug of

abuse consumption is known to induce 'habits', which are a form of procedural memory, which may involve striatal LTP at corticostriatal synapses depending on PKA signaling and transcriptional regulation by CREB (Pittenger et al., 2006). PP1C β repression in the striatum may therefore contribute to the development and maintenance of 'habits' by potentiating PKA signaling and CREB phosphorylation. Whether cocaine, by altering the expression of PP1C β and/or Mecp2 may hijack their functions in learning and memory remains to be determined.

In conclusion, while there is a growing interest for the role of DNA methylation triggered by environmental factors including diet, behavior, parental care, stress, physical activity, or drugs, only a limited number of genes have been characterized in the brain as modulated by DNA methylation in response to drugs of abuse. Our data further support the concept that a pharmacological agent such as cocaine modulates the methylation pattern of genes in adult brain, an epigenetic mark usually considered as a stable covalent modification. The regulation of PP1C β by DNA methylation and MeCP2 underlines a link between these two genes by providing new insights into the mechanism by which MeCP2 mutations alter neurological functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNRS, by the Université de Strasbourg and by the Association Française du Syndrome de Rett (AFSR). SP is a recipient of a fellowship from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. We are grateful to Y. Humeau and B. Poulain for generously providing $Mecp2^{308/Y}$ mice and their $Mecp2^{X/Y}$ littermates and to F. Gambino for genotyping the mice (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 et Université de Strasbourg, France).

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, 4218-4227.
- Adhvaryu, K. K., Selker, E. U., 2008. Protein phosphatase PP1 is required for normal DNA methylation in *Neurospora*. *Genes Dev* 22, 3391-3396.
- Allan, A. M., Liang, X., Luo, Y., Pak, C., Li, X., Szulwach, K. E., Chen, D., Jin, P., Zhao, X., 2008. The loss of methyl-CpG binding protein 1 leads to autism-like behavioral deficits. *Hum Mol Genet* 17, 2047-2057.
- Allen, P. B., Ouimet, C. C., Greengard, P., 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9956-9961.
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., Zoghbi, H. Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.
- Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Villa-Moruzzi, E., Margolis, R. L., 1998. Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 141, 1207-1215.
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., Kalda, A., 2010. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 35, 2450-2461.
- Antequera, F., Bird, A., 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11995-11999.
- Asaka, Y., Jugloff, D. G., Zhang, L., Eubanks, J. H., Fitzsimonds, R. M., 2006. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the *Mecp2*-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21, 217-227.
- Bollen, M., Stalmans, W., 1992. The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27, 227-281.
- Bordelon, J. R., Smith, Y., Nairn, A. C., Colbran, R. J., Greengard, P., Muly, E. C., 2005. Differential localization of protein phosphatase-1alpha, beta and gamma1 isoforms in primate prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15, 1928-1937.
- Carouge, D., Host, L., Aunis, D., Zwiller, J., Anglard, P., 2010. CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol Dis* 38, 414-424.
- Cassel, S., Carouge, D., Gensburger, C., Anglard, P., Burgun, C., Dietrich, J. B., Aunis, D., Zwiller, J., 2006. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70, 487-492.
- Colvis, C. M., Pollock, J. D., Goodman, R. H., Impey, S., Dunn, J., Mandel, G., Champagne, F. A., Mayford, M., Korzus, E., Kumar, A., Renthall, W., Theobald, D. E., Nestler, E. J., 2005. Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25, 10379-10389.
- da Cruz e Silva, E. F., Fox, C. A., Ouimet, C. C., Gustafson, E., Watson, S. J., Greengard, P., 1995. Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci* 15, 3375-3389.
- Deaton, A. M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25, 1010-1022.
- Deng, J. V., Rodriguiz, R. M., Hutchinson, A. N., Kim, I. H., Wetsel, W. C., West, A. E., 2010. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* 13, 1128-1136.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P. A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.

- Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., Levine, M. S., 2002. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* 88, 3010-3020.
- Genoux, D., Bezerra, P., Montgomery, J. M., 2011. Intra-spaced stimulation and protein phosphatase 1 dictate the direction of synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33, 1761-1770.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., Mansuy, I. M., 2002. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970-975.
- Goll, M. G., Bestor, T. H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- Graff, J., Kim, D., Dobbin, M. M., Tsai, L. H., 2011. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* 91, 603-649.
- Haegel, S., Galetzka, D., Zechner, U., Haaf, T., Gamerding, M., Behl, C., Hiemke, C., Schmitt, U., 2010. Spatial learning and expression patterns of PP1 mRNA in mouse hippocampus. *Neuropsychobiology* 61, 188-196.
- Han, J., Li, Y., Wang, D., Wei, C., Yang, X., Sui, N., 2010. Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prelimbic cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol* 642, 93-98.
- Hiroi, N., Fienberg, A. A., Haile, C. N., Alburges, M., Hanson, G. R., Greengard, P., Nestler, E. J., 1999. Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci* 11, 1114-1118.
- Huang, H. S., Matevossian, A., Jiang, Y., Akbarian, S., 2006. Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *J Neurosci Methods* 156, 284-292.
- Hubbard, M. J., Cohen, P., 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18, 172-177.
- Hyman, S. E., 2005. Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162, 1414-1422.
- Im, H. I., Hollander, J. A., Bali, P., Kenny, P. J., 2010. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 13, 1120-1127.
- Iniguez, S. D., Charntikov, S., Baella, S. A., Herbert, M. S., Bolanos-Guzman, C. A., Crawford, C. A., 2012. Post-training cocaine exposure facilitates spatial memory consolidation in C57BL/6 mice. *Hippocampus* 22, 802-813.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyan, S., Feinberg, A. P., 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41, 178-186.
- Klose, R., Bird, A., 2003. Molecular biology. MeCP2 repression goes nonglobal. *Science* 302, 793-795.
- Koshibu, K., Graff, J., Beullens, M., Heitz, F. D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., Mansuy, I. M., 2009. Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* 29, 13079-13089.
- Kundakovic, M., Chen, Y., Costa, E., Grayson, D. R., 2007. DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes. *Mol Pharmacol* 71, 644-653.
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., 3rd, Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B. L., Maze, I., Dietz, D. M., Watts, E. L., Iniguez, S. D., Koo, J. W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A., Ren, Y., Eisch, A. J., Bolanos, C. A., Kabbaj, M., Xiao, G., Neve, R. L., Hurd, Y. L., Oosting, R. S., Fan, G., Morrison, J. H., Nestler, E. J., 2010. Dnmt3a

- regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13, 1137-1143.
- Lesage, B., Beullens, M., Ceulemans, H., Himpens, B., Bollen, M., 2005. Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* 579, 5626-5630.
- Ludwig, M. G., Basset, P., Anglard, P., 2000. Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 275, 39981-39990.
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B. A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Yost, H. J., Virshup, D. M., 2007. Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *Embo J* 26, 1511-1521.
- Miller, C. A., Gavin, C. F., White, J. A., Parrish, R. R., Honasoge, A., Yancey, C. R., Rivera, I. M., Rubio, M. D., Rumbaugh, G., Sweatt, J. D., 2010. Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* 13, 664-666.
- Miller, C. A., Sweatt, J. D., 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857-869.
- Moorhead, G. B., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemee, A., 2007. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 234-244.
- Moretti, P., Levenson, J. M., Battaglia, F., Atkinson, R., Teague, R., Antalffy, B., Armstrong, D., Arancio, O., Sweatt, J. D., Zoghbi, H. Y., 2006. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26, 319-327.
- Muriach, M., Lopez-Pedrajas, R., Barcia, J. M., Sanchez-Villarejo, M. V., Almansa, I., Romero, F. J., 2010. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem* 114, 675-684.
- Nagarajan, R. P., Hogart, A. R., Gwye, Y., Martin, M. R., LaSalle, J. M., 2006. Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics* 1, e1-11.
- Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y., 1997. Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol* 139, 951-961.
- Nic Dhonnchadha, B. A., Katak, K. M., 2011. Cognitive enhancers for facilitating drug cue extinction: insights from animal models. *Pharmacol Biochem Behav* 99, 229-244.
- O'Brien, C. P., Childress, A. R., Ehrman, R., Robbins, S. J., 1998. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *J Psychopharmacol* 12, 15-22.
- Pelka, G. J., Watson, C. M., Radziewicz, T., Hayward, M., Lahooti, H., Christodoulou, J., Tam, P. P., 2006. Mecp2 deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* 129, 887-898.
- Perez, M. F., Gabach, L. A., Almiron, R. S., Carlini, V. P., De Barioglio, S. R., Ramirez, O. A., 2010. Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. *Synapse* 64, 742-753.
- Pittenger, C., Fasano, S., Mazzocchi-Jones, D., Dunnett, S. B., Kandel, E. R., Brambilla, R., 2006. Impaired bidirectional synaptic plasticity and procedural memory formation in striatum-specific cAMP response element-binding protein-deficient mice. *J Neurosci* 26, 2808-2813.
- Portela, A., Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28, 1057-1068.
- Robison, A. J., Nestler, E. J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12, 623-637.

- Shahbazian, M., Young, J., Yuva-Paylor, L., Spencer, C., Antalffy, B., Noebels, J., Armstrong, D., Paylor, R., Zoghbi, H., 2002. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243-254.
- Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Haganir, R. L., Greengard, P., 1998. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18, 10297-10303.
- Strack, S., Kini, S., Ebner, F. F., Wadzinski, B. E., Colbran, R. J., 1999. Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J Comp Neurol* 413, 373-384.
- Tamaru, H., 2010. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev* 24, 1465-1478.
- Vagnarelli, P., Hudson, D. F., Ribeiro, S. A., Trinkle-Mulcahy, L., Spence, J. M., Lai, F., Farr, C. J., Lamond, A. I., Earnshaw, W. C., 2006. Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol* 8, 1133-1142.
- Virshup, D. M., Shenolikar, S., 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33, 537-545.
- Yan, Z., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa, K., Allen, P. B., Fienberg, A. A., Nairn, A. C., Greengard, P., 1999. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat Neurosci* 2, 13-17.
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P. B., Ingrassia, P., Fienberg, A. A., Gonon, F., Greengard, P., Picciotto, M. R., 2002. Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol Psychiatry* 51, 612-620.
- Zachariou, V., Sgambato-Faure, V., Sasaki, T., Svenningsson, P., Berton, O., Fienberg, A. A., Nairn, A. C., Greengard, P., Nestler, E. J., 2006. Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* 31, 555-562.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Effect of Daza on *PP1C α* , *PP1C β* , *Mecp2* and *Reelin* expression in PC12 cells. Cells were treated with Daza at the indicated concentrations at time 0, 24 and 48 h and were harvested after 1 or 3 days, as indicated. RNA was extracted and gene expression was evaluated by RT-qPCR relative to *36B4* mRNA level as a standard. Data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's *t*-test.

Figure 2 *PP1C α* and *PP1C β* expression in PC12 cells treated with 5-HT. Cells were sequentially treated with 5-HT at time 0 and 24 h under low serum concentration and were harvested at time 48 h. The amount of each transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's *t*-test.

Figure 3 Binding of *Mecp2* to the *PP1C β* gene in PC12 cells and expression of *PP1C α* , β and γ in brain dopaminergic structures of wild type and *Mecp2*^{308/Y} mice. (A) Chromatin was prepared from PC12 cells and CHIP assays were performed with (+) or without (-) *Mecp2* antibody or with control IgG. An aliquot of total DNA isolated from chromatin prior to immunoprecipitation was used as input (inp). The enrichment of genomic DNA associated with immunoprecipitated chromatin around the *PP1C β* gene 5'-end was evaluated by PCR and the resulting PCR fragments were run on agarose gel. The *Cdkl5* PCR fragment corresponds to a promoter region previously shown to be bound to *Mecp2*. (B and C) *PP1C α* , β and γ gene expression was evaluated by RT-qPCR in the striatum (B) and the prefrontal cortex (C) of 13 weeks old wild type (wt) and *Mecp2*^{308/Y} mice (308). The gene expression of PP1C isoforms was normalized to that of the *36B4* gene. Data represent the mean \pm SD; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, Student's *t*-test, $n = 3/\text{group}$.

Figure 4 *DNMTs* expression in rat CPU and PFCx in response to chronic cocaine treatment. *DNMT1*, *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were quantified by real time RT-PCR in the CPU and in the medial part of the PFCx of rats treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 10 days. The time course of *DNMT* expression was evaluated at the indicated time after the last cocaine injection. Data represent the mean \pm SEM; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, Student's *t*-test, $n = 3\text{-}4/\text{group}$.

Figure 5 DNA methylation status of the *PP1Cβ* 5'-flanking sequence. (A) The distribution of CpG dinucleotides and the position of the CpG island are indicated relative to the transcription start site (+1). (B) Striatal genomic DNA extracted from rats treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 10 days was sheared by sonication and immunoprecipitated with anti-5-methylcytosine antibody. The enrichment of methylated DNA relative to input genomic DNA near the *PP1Cβ* gene transcription start site was quantified by qPCR. Data represent the mean ± SEM (*, $p < 0.05$, two-tailed t -test; $n = 4/\text{group}$). (C) Representative PCR products are illustrated following IP performed with (+) or without (-) antibody or with control IgG or performed on input (Inp) genomic DNA. PCR was also performed on input (Inp) genomic DNA.

Figure 6 *In vivo* binding of Mecp2 to the *PP1Cβ* 5'-end. (A) Position of primers used to analyze chromatin immunoprecipitated fragments are indicated by arrows below the *PP1Cβ* 5'-flanking region. (B) Chromatin was isolated from the CPu of rats treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 1 (acute) or 10 (chronic) days, as indicated. The relative binding of Mecp2 to *PP1Cβ* was evaluated 12 h after the last cocaine injection by real time PCR performed on DNA extracted from sonicated chromatin immunoprecipitated with anti-Mecp2. Two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc were performed. Each normalized value represents the average of 6 independent determinations ± SEM (*, $p < 0.05$), $n = 3/\text{group}$. (C) The increase in Mecp2 binding to *PP1Cβ* in response to chronic cocaine treatment is illustrated by representative qPCR products loaded on agarose gels following ChIP assays performed with (+) or without (-) Mecp2 antibody or with control IgG. PCR was also performed on an aliquot of total DNA isolated from chromatin prior to immunoprecipitation as an input control (inp).

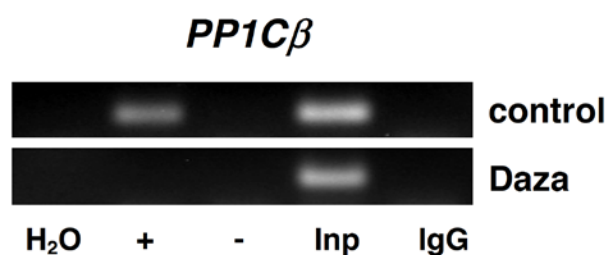
Figure 7 Time course of *PP1Cα* and *β* mRNA expression following chronic cocaine treatment. The effect of repeated cocaine administration on *PP1Cα* and *β* mRNA levels at 5, 10 and 15 h after the last injection was evaluated by quantitative RT-PCR in the caudate putamen (CPu) and in the medial part of the prefrontal cortex (PFCx). The amount of each transcript was normalized to that of 36B4 mRNA. Data represent the mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed t -test, $n = 3-4/\text{group}$.

Figure 8 Altered PP1C β protein expression in brain structures after cocaine treatment. Immunohistochemistry of PP1C β in PFCx (A) and CPu (B) of rats treated repeatedly (10 days, one i.p. injection per day) with saline or 20 mg/kg cocaine. Rats were sacrificed 12 h after the last injection and coronal brain sections were incubated with an antibody directed against PP1C β . Scale bar applicable to all micrographs, 50 μ m. No primary antibody refers to experiments in which the primary antibody was omitted in control rats. (C) Quantification of PP1C β immunoreactivity was carried in the PFCx, the CPu, the NAc core (NAcC) and the NAc shell (NAcS) of rats treated with saline or cocaine for 1 (acute) or 10 (chronic) days. Data represent the mean \pm SEM (* significantly different from the chronic NaCl group; # significantly different from the acute cocaine group, two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc; n = 4/group; PFCx: *p<0.01, #p<0.01; CPu: *p<0.01, #p<0.005; NAcC: *p<0.01, #p<0.005; NAcS: *p<0.005, #p<0.001). (D) The time course of PP1C β positive cells was analyzed in the CPu following acute or chronic cocaine treatment. Data represent the mean \pm SEM (** significantly different from the chronic NaCl group 12 h, p<0.01; * significantly different from the chronic NaCl group 20 h, p<0.05; Student's *t*-test, n = 4/group). (E) Western blot analysis of PP1C β in rat CPu 12 h after acute or chronic cocaine treatment. Identical amount of proteins from whole CPu extract were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The same blot was probed successfully with anti-PP1C β antibody and with anti- α -tubulin antibody as a loading control and is representative of experiments performed with 3 sets of CPu extracts. Apparent molecular weights are indicated at the right.

Supplemental data**Supplemental Figure S1.**

ChIP experiments were performed with PC12 cells exposed to 10 μ M Daza in conditions similar to those described in figure 3A. The PCR products were analyzed on agarose gels. Binding of MeCP2 to the *PP1C β* 5'-end can be observed in PC12 control cells. No binding was observed in cells treated with Daza, since no *PP1C β* PCR fragment was detected. H₂O indicates that no DNA template was added in the qPCR reaction.

ChIP was performed in the presence of MeCP2 antibody (+), in the absence of antibody (-) or in the presence of IgG (IgG). The gel is representative of two ChIP experiments.



Supplemental Figure S2.

Alignment of the rat *PP1Cβ* 5'-sequence with human and mouse sequences. The rat *PP1Cβ* sequence (middle) is compared with the human (top) and the mouse (bottom) sequences within the CpG island. The transcription (**G**) and the translation (**ATG**) start sites are indicated in red within the rat sequence and the 5'-untranslated region is highlighted in yellow. CpGs that are conserved at least in two species are indicated in bold.

```

Human          ACGTGGCGCGCACGCGCGCC 243
Rat            ACGTGGCGCGCGTGC CGCGCA 292
Mouse         ACGCGGCG-----GCGCGC- 23
                ***   ***           *
                ***   ***           *

GCTCGGCAAGGCTGGGC-----AAGGGCGGAGGGGAGGGAGTGACCGCT 286
GTTCGGC CGCGCTAGGCGGCCCGCAAGGGCGGAGGGGAGGGAGTGACCGCT 342
-----AAGGGACTGCGGAGTGAGTGGCGCT 49
                *****   * *   *****   *****   *****

GAGGGCGGGGCTGTCCCGCGTCGCCCGCGAGCTT-GCGGAGCTGGGCGGTG 335
GAGGGCGGGGCTGTCCCGTGGCGCTGCCGAGCTTTGCGGAGCTGGGCGGTG 392
GCGGGTGGGGCCGTCCGCGCGCTGGTGAGCTTTGCGGAGCTGGGCGGTG 99
*   ***   *****   * *   * *   * *   * *   * *   * *   * *   * *   * *   * *

CCGAGGAGGAGGAGGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCGGGCTGGGGTCTGACCG 385
CCGAGGAGGAGG-----TGGAGGAGGCGGTGGCGGGCTGGGGTCTGACCG 436
CCGAGGAGGAGGA-----GGTGGCGGCCTGGGTCTGACCG 134
*****   *****   *****

GGCCCG-----GTTCGTGGGGGCC-CGCTTGTTTATTT 417
GGCCCGTTCCTGACCGGCCCGGTTTCTGGGGGCC-TGCTTGTTTATTT 485
GGCCCT-----GTTCGAGGGGGCCTCTCTTGTTTATTT 167
*****   ****   *****   *****

ATTTATTTCTAGTGGGTGCCCGCCGGCGTGTCGCGCGCTCTCGCTGCTCG 467
ATTTATTTCCAGTGGGCGCCCGCCAGCGTGTCGCGCGCTGTCGCTGCTCG 535
ATTTATTTTCCGTGGGTGCCCGA-GTGTCGCGCGCTCTCGCTACCG 216
*****   *****   * *   * *   *****   *****   * *

GCGGGGAGGGGTGGGGGAGGGCCGGCGCCCGGGGGGAGTTGGAGCG 517
GCGGGGAGGGGTGGGGGAGGGCCCGCGCCCGGGGGGAGTTGGAGCG 585
GCGGGGAGGGGTGGGGGAGGGCCCGGGAAAAGGGGAGTTGGAGCG 266
*****   * *   *****

GGTCGAAACCGCCCGGTGACTCGTAGGTGAGA--ACCGCCCGAGCTACCACCG 565
GGTCGAAACCGCCCGGTGACTCGTAGGTGAGA--ACCGCCCGAGCCCGCCCG 633
GGTCGAAACCGCCCGGTGACTTGTAGGTGAGAGAACGCCCGAGCCCGTCGCCCG 316
*****   *****   *****   * * *

CCGCGCCCGCTGCCCGCCCGGAGAAAGCCCTTGTTCCGCTGC-GGGGAGG 614
CCGCGCG-----AGAAGCCCT-GTTAACGCTTT-AGGGAGG 666
CAGCCTCCCGCCCG-----AGAAGCCCTTGTTCCGCTGCCGTGGGAAGG 360
*   * * *   *****   * *   * * *   * *   * *

```

```

AGAGTCTGGTGCCTACAAGATGGCGGACGGGGAGCTGAACGTGGACAGCC 664
AGAGTCTGGTGCCGACAAGATGCGGACGGGGAGCTGAACGTGGACAGCC 716
AGAGTCTG-TGCCCGACAAGATGGCGGACGGGGAGCTGAACGTGGACAGCC 409
*****
TCATCACCCCGCCTGCTGGAGGGTGAGTGCGGCGCGCGGGTCTCCTCTCAGC 714
TCATCACCCCGCCTGCTGGAGGGTGAGTGCGGCGCGCGGCTCGTCTCCCCAC 766
TCATCACCCCGGCTGCTGGAGGGTGAGTGCG-CGCCTGGCCGCGGGACAGA 458
*****
-----CCGGCCGCGGGGCCCTTCCCGCTCGAGCCGAGCTCCCGAGGAG 758
-----CCGGCCGCGGGGCCCTTCCCGCTCGAGCTGAGGTCGGAGAGGAG 810
GGGAGGTCGGGCACCCGCCGCCGACCCCTGCGTCCCCGTCTGCCCGCCGAA 508
      *** * * *      ** *** ** *      *      ***
GGC-----GGGCGGGTCGGGT----GCCCCAGGAGG--- 785
GGCAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCCGGGT----GCCCCAGGAGG--- 853
CGC-----GAGGGGACCCCTTCCCGCCCCGAGACGAGT 542
**                * * * * * *      * * * * * *
--CCCAGAGCGCGGGCTGGCGGGCGG----GCGGGGAGGCCGGGGCTG--- 826
--CCAGGAGCGCGGGCTGGCGGGCGGGCAGGCGGGGAGGCCGGGCCGAGC 901
CTCTGGGAGCGCGGCGCGGCGGACGAAC---CGAGGAGG--GGGCGAGG- 586
  *      * * * * * *      * * * * * *      * * * * * *
-AGGCCCCGAGGCCCATCGACCGGTACAGCCTTCCGGAGAG-GCGGCCGTG 874
GAGGCCGGAGGCCCATCGGCTGGTACAGTCTTCCCGAGAG-GCGGCCGGG 950
-AGGCTCTGGGCGCG--GG--GGAGCGGCCT--CTGGGAGCGCGGTCAGG 629
****      *** *      *      ** * * * *      * * * * * * * *

```


FIGURES

Figure 1

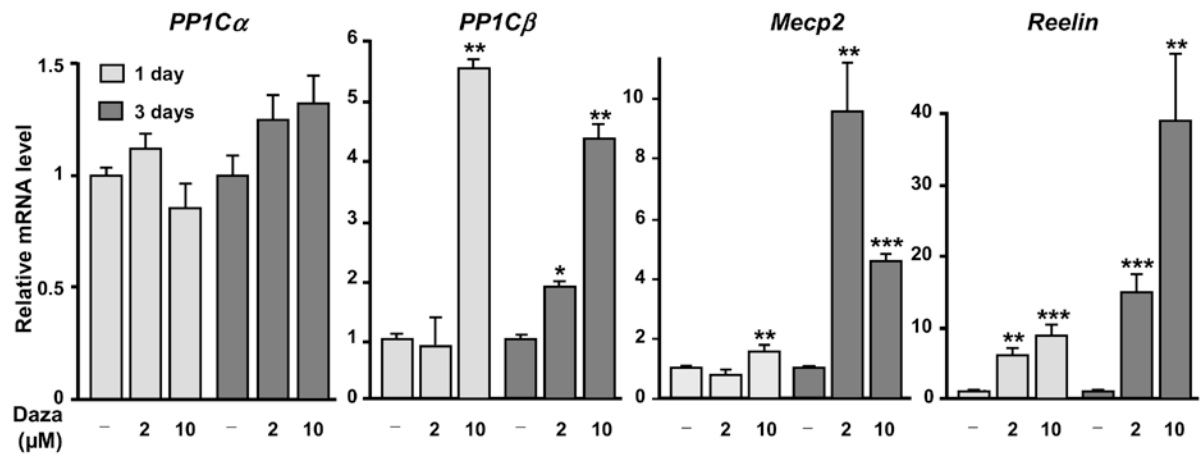


Figure 2

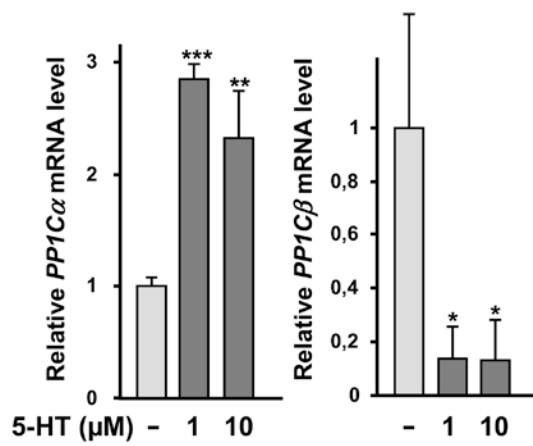


Figure 3

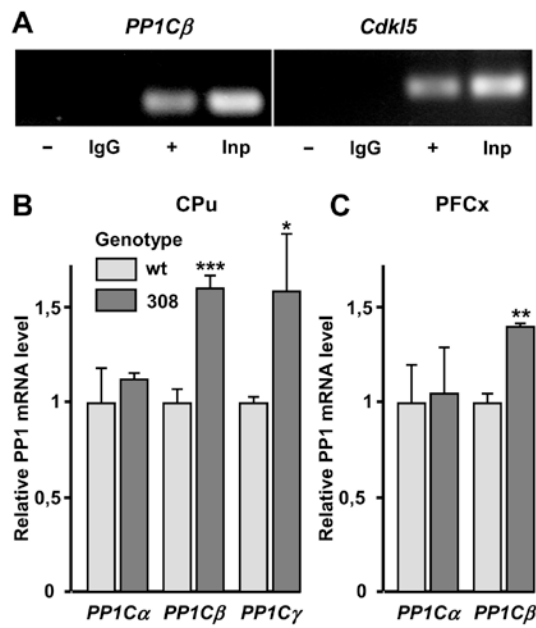


Figure 4

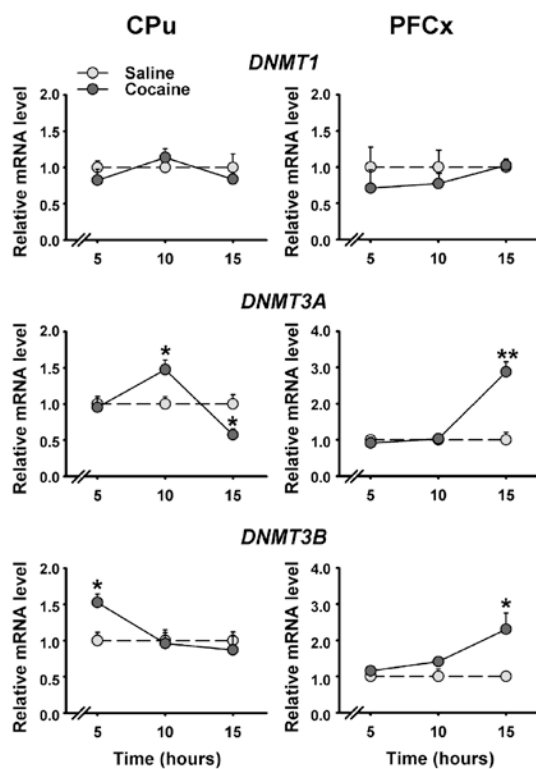


Figure 5

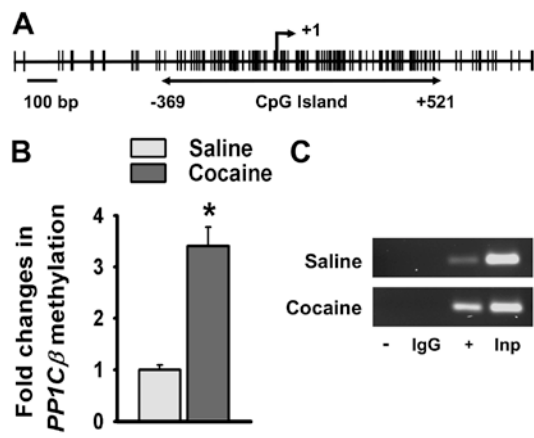


Figure 6

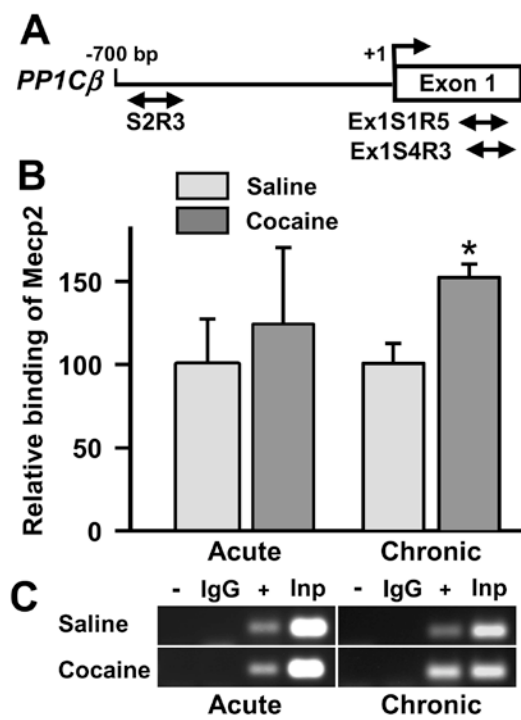


Figure 7

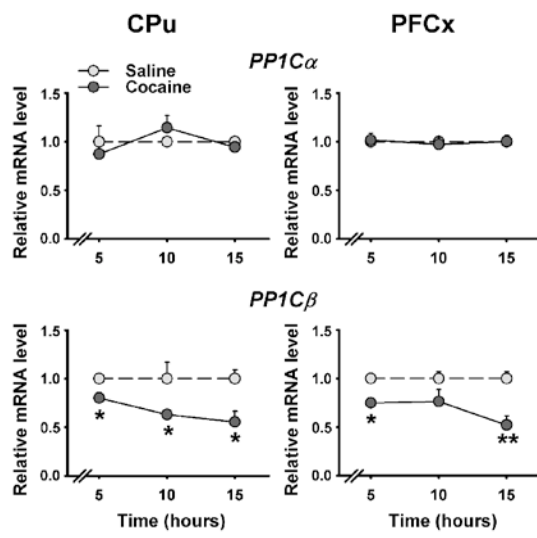
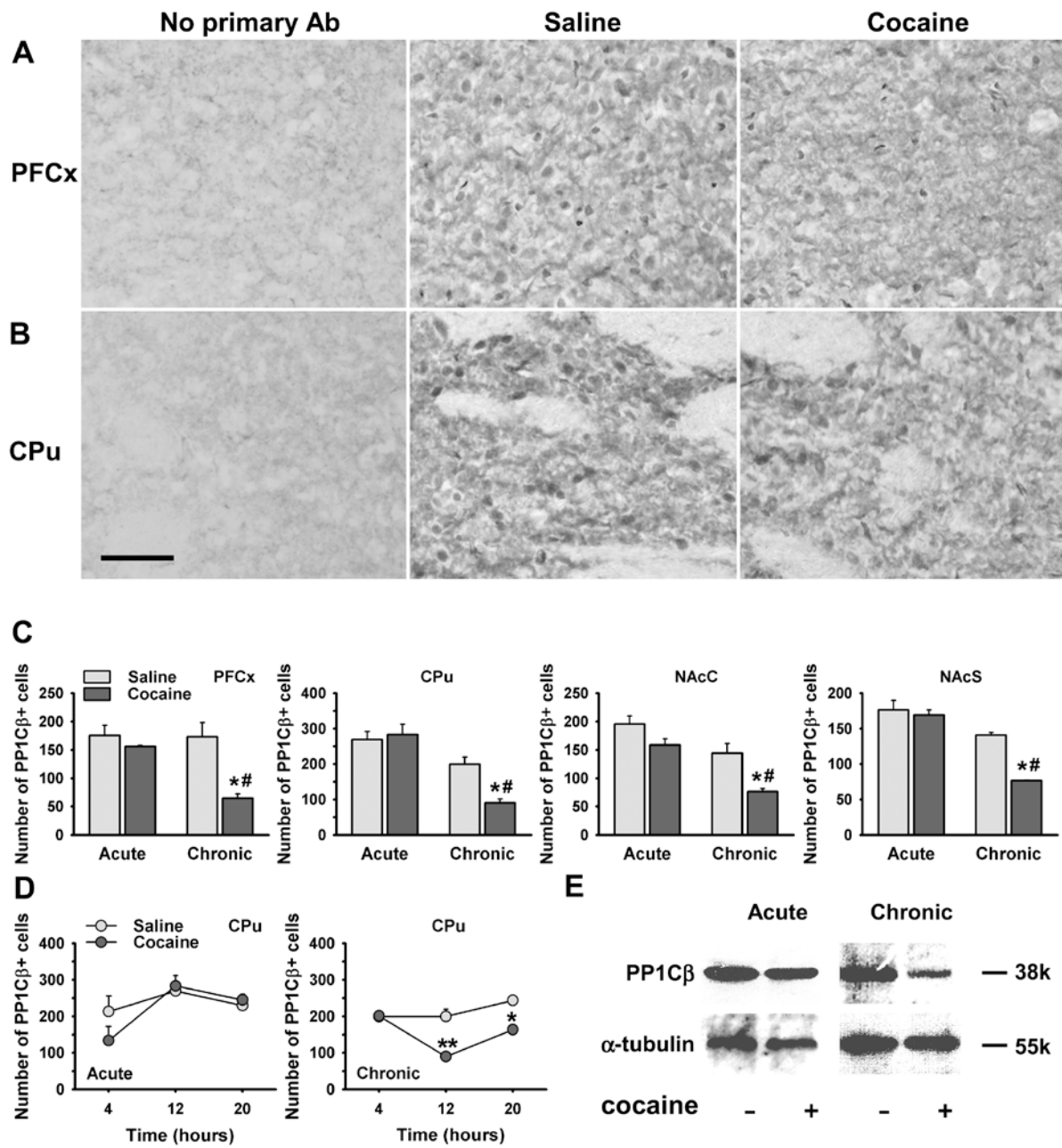


Figure 8



ARTICLE 2

Nous avons montré dans le premier article que des injections répétées de cocaïne induisaient une répression du gène *PP1C β* , par un mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN et de *Mecp2*. *PP1* étant impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Genoux et coll., 2002 ; Miller et Sweatt, 2007 ; pour revue : Munton et coll., 2004), nous nous sommes demandés si l'expression du gène *PP1C β* pouvait être régulée de façon différente en réponse à des injections passives de cocaïne et à des injections volontaires de cocaïne dans un test de conditionnement opérant, l'AA de cocaïne. Afin de dissocier les effets de la cocaïne de ceux du conditionnement opérant, sur l'expression du gène *PP1C β* , nous avons utilisé trois groupes expérimentaux : un groupe de rats s'auto-administrant volontairement la cocaïne, un groupe de rats recevant passivement des injections de cocaïne et un groupe de rats recevant passivement des injections de NaCl 0,9%. Pour que le nombre d'injections soit similaire entre les différents groupes expérimentaux et qu'elles soient délivrées exactement au même moment, les rats des deux derniers groupes expérimentaux ont été appariés à des rats qui s'auto-administraient volontairement la cocaïne. Ainsi, en comparant les rats recevant passivement des injections soit de cocaïne, soit de NaCl 0,9%, nous avons pu évaluer l'effet de la cocaïne sur l'expression du gène *PP1C β* . L'effet du conditionnement opérant a quant à lui été mis en évidence par la comparaison des rats s'auto-administrant volontairement la cocaïne à ceux recevant passivement les injections de cocaïne.

Comme dans l'article précédent, nous avons observé une répression du gène *PP1C β* en réponse à des administrations répétées de cocaïne. Cette répression était similaire entre les rats recevant des injections passives de cocaïne et ceux s'auto-administrant volontairement la cocaïne, en dépit du rôle établi de *PP1* dans les processus d'apprentissage et de mémoire. La répression de *PP1C β* par la cocaïne était corrélée à une augmentation des taux de *Mecp2*, ce qui suggère, d'après les résultats obtenus dans le premier article, une régulation de l'expression de *PP1C β* par un mécanisme impliquant la méthylation de l'ADN et le recrutement de *Mecp2*.

Etant donné que les drogues et les récompenses naturelles (nourriture, eau, comportement sexuel...) activent le système de récompense, mais qu'elles y induisent des neuroadaptations spécifiques à chacun des types de renforçateurs (Carelli et coll., 2000 ; Levy et coll., 2007 ; Chen et coll., 2008), nous nous sommes demandés si la régulation de l'expression de *PP1C β* et de *Mecp2* pouvait être différente si la cocaïne était remplacée par

de la nourriture. De manière intéressante, le profil d'expression des gènes *PP1C β* et *Mecp2* différerait totalement de celui obtenu dans le cas de la cocaïne. Nous n'avons en effet observé aucune modification de l'expression ni de *PP1C β* , ni de *Mecp2*, en réponse à une distribution passive de pastilles de nourriture. Par contre, une induction de l'expression de *PP1C β* et de *Mecp2* a été mise en évidence chez les animaux déclenchant volontairement la libération de pastilles de nourriture par rapport à ceux les recevant passivement, indiquant un effet du conditionnement opérant à la nourriture sur la régulation de l'expression de ces deux gènes.

Nos données indiquent donc que l'implication de *PP1C β* dans le conditionnement opérant est modifiée par la cocaïne. Elles renforcent l'hypothèse selon laquelle la cocaïne perturberait les processus d'apprentissage et de mémoire, et que la dépendance serait, au moins partiellement, une pathologie de l'apprentissage (Di Chiara, 1999).

Par ailleurs, nos résultats ont permis d'identifier deux gènes, *PP1C β* et *MeCP2*, dont l'expression est différemment régulée par la cocaïne et la nourriture. Ils sont par conséquent susceptibles de participer aux neuroadaptations spécifiques permettant de différencier les mécanismes induits par les drogues de ceux induits par les récompenses naturelles.

Protein Phosphatase-1C β is differentially regulated in response to natural reinforcers or drugs of abuse

**Sarah Pol Bodetto, Pascal Romieu, Carolina Coehlo Tesone,
Monique Majchrzak, Alexandra Barbelivien, Jean Zwiller and
Patrick Anglard***

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237
CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

En préparation.

ABSTRACT

Cocaine exposure induces changes in the expression of an array of genes, in part through epigenetic modifications. We have previously shown that cocaine induced the expression of two chromatin remodeling proteins, methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) and histone deacetylase 2 (HDAC2). We characterized protein phosphatase-1C β (PP1C β) as a novel target gene of the MeCP2/HDAC2 complex. PP1 is involved in synaptic and structural plasticity, and notably in learning and memory processes. We therefore investigated whether *PP1C β* could be differentially regulated by passive cocaine injections vs voluntary cocaine intake using a cocaine operant self-administration paradigm. We also checked whether cocaine would regulate *PP1C β* expression differently, when compared to food intake. *MeCP2* and *HDAC2* expression were also analyzed. We found a similar cocaine-induced repression of *PP1C β* expression in reward-related brain structures, independently on the administration mode (passive vs self-administered), suggesting that some PP1-regulated learning/memory mechanism was modified by cocaine. PP1C β repression was correlated with an increase in MeCP2 expression, comforting the concept that *PP1C β* is under the control of DNA methylation. A different pattern of expression was observed upon food intake. *PP1C β* expression was increased during food operant self-administration, but not in response to passive food delivery. We also observed an induction of MeCP2 during food operant conditioning, highlighting MeCP2 involvement in learning and memory processes. Together, the data show that PP1 implication in operant conditioning expression was altered by cocaine, further supporting the concept that addiction is, at least in part, a learning disorder.

Introduction

Cocaine exposure is known to induce changes in gene expression in various brain structures related to the reward system (Maze and Nestler, 2011). The transcriptional modifications can be rapid and transient, but can also be persistent and therefore underlie neural and behavioral adaptations triggered by cocaine. It has been shown that epigenetic modifications are involved in both cocaine-induced gene expression changes and cocaine-related behaviors (Cassel *et al.*, 2006; Romieu *et al.*, 2008; Host *et al.*, 2010; Graff *et al.*, 2011; Robison and Nestler, 2011). Among the epigenetic factors, we found that cocaine induced the expression of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) and histone deacetylase 2 (HDAC2), two proteins involved in transcriptional repression through chromatin compaction (Cassel *et al.*, 2006; Host *et al.*, 2011). We also demonstrated that cocaine triggered changes in DNA methylation in adult rat brain (Carouge *et al.*, 2010).

We previously characterized the β catalytic subunit of protein phosphatase-type 1 (*PP1C β*) as one of the genes repressed by repeated intraperitoneal cocaine injections, through cocaine-induced DNA hypermethylation of its promoter region. PP1 is highly expressed in the brain and its involvement in synaptic and structural plasticity is well documented (Ceulemans and Bollen, 2004; Colbran, 2004; Munton *et al.*, 2004). Genetic inhibition of PP1 in forebrain neurons has been correlated with learning and memory improvement and decrease in forgetting (Genoux *et al.*, 2002), highlighting a role of PP1 as a learning and memory suppressor.

It is well established that drugs of abuse exert their rewarding effects by hijacking the reward system normally activated by natural rewards. However, even if the same brain structures are implicated, the neural circuits involved inside these brain regions differ when considering drugs of abuse or natural rewards. For instance, the circuit activated by cocaine in the nucleus accumbens is distinct from the circuit that processes information about food and water reward (Carelli *et al.*, 2000). It has also been shown that cocaine, as opposed to sucrose or food self-administration, triggers persistent long-term potentiation in the ventral tegmental area (Chen *et al.*, 2008). Moreover, we have shown that cocaine self-administration was decreased by the HDAC inhibitor trichostatin A, whereas sucrose self-administration was not (Romieu *et al.*, 2008).

Considering PP1 involvement in learning and memory processes, we investigated here whether *PP1C β* could be differentially regulated by passive cocaine administration vs voluntary cocaine intake in an operant conditioning task. We also investigated whether cocaine and food, a natural reinforcer, could differentially regulate the expression of the *PP1C β* gene. The expression of the chromatin remodeling proteins MeCP2 and HDAC2 was evaluated in parallel.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier, France), weighting 160-180 g, were housed individually in standard home cages, in a temperature- and humidity-controlled room, under an inverted 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 P.M.). Animals were allowed to acclimate to laboratory conditions and were handled at least one week before experimental procedures. Each behavioral experiment started 3 weeks after their arrival at the laboratory, in order to allow correct inversion of the light/dark cycle of the animals, and was conducted during the dark period. Animals used for cocaine operant self-administration (n = 28) had *ad libitum* access to food and water, whereas animals used for food pellets operant self-administration (n = 31) had *ad libitum* access to water, but were food restricted. Rats were therefore weighted every day over the 2 weeks before the beginning of the food pellets operant self-administration experiment and during the whole behavioral procedure. Their body weight was progressively reduced to 85% of its free-feeding value. It was maintained at this level throughout the whole experiment by providing an individually adjusted amount of food after each daily testing session. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies (Council directive 87848, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection animale, permission 67-165 to JZ).

Cocaine operant self-administration

Surgery. Surgical implantation of a chronic indwelling catheter in the jugular vein was performed 10 days after the arrival of the rats at the laboratory. After surgery, animals were allowed to recover for 7-10 days before the beginning of the cocaine operant self-administration procedure. Intravenous catheterization procedure was performed as described previously (Caine *et al.*, 1993). Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection (1 ml/kg) of a 5:1 (v/v) mixture containing 0.1 g/ml ketamine (Imalgene 1000) and 2% xylazine (Rompun, Centravet), before surgical implantation of a chronic indwelling catheter in the right jugular vein. The catheter, which consisted of SILASTIC tubing 12 cm long (0.3 mm inner diameter x 0.63 mm outer diameter; SILASTIC, Plastics One), was fitted to a 22 gauge guide cannula (Plastics One) that was bent at a right angle and then embedded in dental

cement on a circular 2.5 cm mercylene mesh base. A discrete incision was performed onto the right jugular vein; the heparinized catheter was immediately inserted 3.6 cm into the vein and anchored with suture. Catheters were flushed daily with 150 μ l of a solution mixture containing 300 U/ml heparin and 0.1 g/ml ampicillin to prevent clotting and infection.

Apparatus. Studies were conducted in dark operant chambers (30 x 30 x 30 cm) located in a sound-attenuated room. A single channel fluid swivel (Instech Laboratories) was mounted on a balanced arm above each chamber. A computer-driven syringe pump (Imetronic) activated a 10 ml syringe and pushed fluid into SILASTIC tubing (0.63 mm inner diameter x 1.19 outer diameter) connected to the rat through its externalized 22 gauge guide cannula. Each chamber was equipped with two 3 cm-diameter holes on the same wall, located 4 cm above the floor. Disruption of an infrared photobeam in each hole was detected using a digital input card (DIO-24, National Instruments) and home-made LabView software (National Instruments) and was considered as a Nosepoke (NP). NPs into both holes were recorded. One hole was selected as the active hole for delivering either the cocaine or the saline solution depending on the experimental group considered, and the other as the inactive hole. They were counterbalanced between right and left position both in each experimental group and in the various groups of rats.

Cocaine self-administration procedure. Rats were divided into three different experimental groups: cocaine self-administering rats ('SA cocaine', n = 10), rats passively injected with cocaine ('Yoked cocaine', n = 10) or saline ('Yoked NaCl', n = 8). Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich) solution was adjusted with 0.9% NaCl to infuse an intravenous dose of 0.33 mg/kg/injection.

For the 'SA cocaine' group, NPs into the inactive hole had no programmed consequence. When the required number of NPs into the active hole was reached, a 40 μ l cocaine solution was delivered ~ 2 s under the control of the computer. A stimulus light, located 20 cm above the active hole, was paired contingently with the delivery of cocaine (light on during 2 s), and then turned off, replaced by the house-light of the operant chamber, which materialized the 40 s time-out period. For cocaine self-administration procedure (LeSage *et al.*, 1999), 'SA cocaine' rats were first submitted to a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement during daily 2 h sessions for 4 days. In this schedule, each NP into the active hole during the valid period triggered an intravenous infusion of cocaine solution. Rats were then submitted to a

FR5 schedule of reinforcement during daily 2 h sessions for 6 days. In this schedule, 5 NPs into the active hole during the valid period were required to trigger an intravenous infusion of cocaine solution. No cutoff was applied concerning the number of self-infusions the rat was able to perform during each session.

In order to dissociate the effects of voluntary cocaine taking from the pharmacological effects of cocaine, two yoked groups were included. Each rat in these groups was paired with a rat of the 'SA cocaine' group. Yoked rats received passively the same infusions of cocaine ('Yoked cocaine' group) or saline ('Yoked NaCl' group) that the paired rats self-administered voluntarily. Indeed, the timing and the number of yoked cocaine ('Yoked cocaine' group) or saline ('Yoked NaCl' group) infusions and associated cues were based on NPs responses of a 'SA cocaine' paired rat.

Food pellets operant self-administration

Apparatus. Dark five-choice operant chambers (Bioseb, BP 89 92370 Chaville, France) placed in sound-attenuated and ventilated enclosures were used to test food pellets operant self-administration. Each chamber consisted of an aluminum enclosure (25.2 x 28 x 24 cm). The curved rear wall comprised nine contiguous 2.3 cm square hole, located 2.2 cm above the grid floor. Each hole was equipped with an infrared photocell beam to detect NPs. The two farthest holes were used as the active and the inactive holes, the other holes being obstructed by a metal cover. NPs into both holes were recorded. The active and inactive holes were counterbalanced between right and left position both in each experimental group and in the various groups of rats. As for the cocaine operant self-administration experiment, the active hole was associated with the automatic delivery of a food pellet (45 mg, Bioserv) into a magazine located at the opposite side of the chamber and equidistant from each hole. The rat collected the delivered food pellet by pushing a Perspex panel covering the magazine. Each chamber was automatically controlled by Packwin software (Panlab S.P., Cornella, Barcelona, Spain) and data were collected *via* a microcomputer.

Food pellets operant self-administration procedure. As for the cocaine operant self-administration experiment, rats were divided into three different experimental groups: rats self-delivering food pellets ('SA pellets', n = 11), rats receiving passively food pellets ('Yoked pellets', n = 12) or not ('Yoked control', n = 8).

Training procedure. ‘SA pellets’ and ‘Yoked pellets’ rats were initially given access to food pellets in their home cage (10 pellets per day during 5 consecutive days) to familiarize them with the reinforcer. Each rat was always placed in the same chamber throughout the experiment. In a first training phase (one session), rats from every group were placed in the chambers for 15 min with the house-light off and the panel of the magazine being blocked in order to maintain the food magazine open. For the ‘SA pellets’ and the ‘Yoked pellets’ groups, the magazine was filled with 15 food pellets to familiarize rats to eat the reinforcer in the magazine. On the contrary, the magazine remained empty for the ‘Yoked control’ rats. In a second training phase, rats received two food magazine training sessions (20 min per session, 1 session per day), in which 20 food pellets were delivered in the magazine according to a variable time schedule (mean = 60 s) for the ‘SA pellets’ and the ‘Yoked pellets’ groups. No pellet was delivered for the animals of the ‘Yoked control’ group. The house-light of the operant chamber was turned off during this phase. On the first session, the panel of the magazine was blocked in order to maintain the food magazine open. For the second session, as for the sessions of the food pellets operant self-administration procedure, rats had to push away the panel in front of the food magazine to retrieve the food pellet.

Food pellets operant self-administration procedure. The same procedure as the one used for cocaine operant self-administration was performed for this experiment.

Briefly, ‘SA pellets’ rats were first submitted to a FR1 schedule of reinforcement during daily 2 h sessions for 4 days, and then to a FR5 schedule of reinforcement during daily 2 h sessions for 6 days. When the required number of NPs into the active hole was reached, a food pellet was automatically delivered into the magazine. NPs into the inactive hole had no programmed consequence. No cutoff was applied concerning the number of food pellets delivered the rat was able to voluntarily induce during each session.

As for cocaine operant self-administration, two yoked groups were also included. Each rat in these groups was paired with a rat of the ‘SA pellets’ group. Yoked rats received passively the same amount of food pellets (‘Yoked pellets’ group) or control (‘Yoked control’ group, no food pellet delivered) that the paired rats self-administered voluntarily.

Reverse Transcription-quantitative PCR analysis

Animals (n = 3-6 per group) were sacrificed 24 h after the beginning of the last session of operant self-administration and brain structures of interest were dissected, as previously described (Jouvert *et al.*, 2004). RNA was extracted (Ludwig *et al.*, 2000) from rat medial prefrontal cortex and caudate putamen and first strand cDNA was generated from 0.5 µg of total RNA using random primers and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The reaction product was used for real time PCR performed with a Light Cycler instrument and technology (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), as previously described (Carouge *et al.*, 2010). Primers for rat *Mecp2*, *HDAC2* and *PP1Cβ* were from Sigma-Aldrich Co. and are listed in Table 1. Results were normalized to *36B4* used as an internal control (*36B4* primers also listed in Table 1). Primers were designed with Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) used under stringent conditions and amplicons were selected to span exon borders to exclude false positive detection of genomic contaminations. Cycling conditions were: 95°C for 14 min, then 55 cycles of 95°C for 14 s, 60°C for 18 s and 72°C for 18 s. The specificity of each PCR product was verified by melting curve analysis and confirmed by 2% agarose gel electrophoresis. Real time PCR was conducted three times for each gene of interest, with samples in duplicates.

Immunohistochemistry

Twenty-four hours after the beginning of the last session of operant self-administration, rats (n = 4-6 per group) were sacrificed by an overdose of pentobarbital (100 mg/kg, intraperitoneal injection) and perfused transcardially with 100 ml saline followed by 1% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (250 ml PBS). The brain were post-fixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 1 h before being kept overnight at 4°C in 15% sucrose, then frozen in isopentane at -40°C, and finally stored at -80°C. Coronal tissue sections (16 µm thick) were prepared using a Microm HM560 S_18 Cryostat. Immunohistochemistry was carried out essentially as described previously (Cassel *et al.*, 2006). Antibody incubation was performed overnight either with rabbit anti-Mecp2 polyclonal antibody (Millipore, France) diluted 1:150 in PBS, or with rabbit anti-HDAC2 polyclonal antibody (Millipore, France) diluted 1:250 in PBS, or with purified rabbit anti-PP1Cβ polyclonal antibody (Millipore, France) diluted 1:50 in PBS. The PP1Cβ antibody was raised against the purified peptide (PRTANPPKKR, amino acids 318-327) corresponding to the C-terminus of PP1Cβ catalytic

subunit (Strack *et al.*, 1999). Images of each region of interest were obtained using a microscope (Olympus: Vanox AHB3; x 20 objective) equipped with a digital camera. For each experimental condition, the number of Mecp2- or HDAC2- or PP1C β -immunoreactive cells in the prefrontal cortex (anterior cingulate cortex), the caudate putamen (dorsolateral part) and the nucleus accumbens (core and shell parts) was determined using the Image J software. The number of immunoreactive cells was counted bilaterally on four consecutive sections per rat, before being averaged to generate the final means. Mecp2 and HDAC2 counting was performed with a home-made semi-automatic counting macro, whereas PP1C β counting was performed manually, the contrast being less pronounced. Each counting was performed twice by an investigator blinded to the identity of the samples.

Statistical analysis

Behavioral experiments. In order to evaluate a preference for the active vs inactive hole, the percentage of Nosepokes into the active hole (%NPa) was compared to 50%. Daily performance as well as the mean performance realized during the FR1 period (mean(FR1)) and the FR5 period (mean(FR5)) were compared to 50%. The acquisition of the task was evaluated by comparing the %NPa to 80%, which was considered as the acquisition criterion. Daily performance as well as the mean performance realized during both FR1 (mean(FR1)) and FR5 periods (mean(FR5)) were compared to 80%. The number of Nosepokes in the active (NPa) and the inactive hole (NPi) was evaluated during both FR1 and FR5 periods with two-way ANOVA ('active/inactive' and 'FR1/FR5') with repeated measures. The number of rewards self-delivered was assessed by one-way ANOVA with repeated measures in order to evaluate 'Day' effect. 'FR' effect was also assessed by one-way ANOVA with repeated measures. Neuwman-Keuls post-hoc was performed, when required. Significance was set at $p < 0.05$.

Reverse transcription-quantitative PCR analysis and immunohistochemistry. One-way ANOVA was performed to evaluate 'Group' effect. Neuwman-Keuls post-hoc was performed, when required. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Cocaine operant self-administration

Rats that self-administered cocaine rapidly learned the operant conditioning task.

Rats that self-administered cocaine were first submitted to an FR1 schedule of reinforcement for 4 days, and then to an FR5 schedule of reinforcement for 6 days. They self-administered about 110 cocaine injections per day during the whole experiment (Figure 1A: no 'Day' effect: $F_{(9,81)}=1.18$, $p=0.320$; no 'FR' effect: FR1 vs FR5, $F_{(1,9)}=3.38$, $p=0.554$). This could be explained by the fact that they showed a preference for the active hole from the first day of self-administration, as their percentage of NP in the active hole (NPa) was significantly different from 50% (Figure 1B: %NPa the 1st day of FR1 vs 50%: $p<0.001$; mean(FR1) vs 50%: $p<0.005$; mean(FR5) vs 50%: $p<0.001$). They reached the acquisition criterion of 80% NPa after the switch from the FR1 to the FR5 schedule of reinforcement, that is after the 5th day of self-administration (Figure 1B: %NPa the 5th day vs 80%: $p=0.300$; %NPa the 6th day vs 80%: $p<0.05$; mean(FR1) vs 80%: $p=0.762$; mean(FR5) vs 80%: $p<0.05$). On the contrary, no preference for one or the other hole was observed in both yoked groups, neither during the FR1, nor during the FR5 schedule of reinforcement, as their percentage of NPa did not differ from 50% (Figure 1B: 'Yoked cocaine' rats: mean(FR1) vs 50%: $p=0.581$; mean(FR5) vs 50%: $p=0.904$; 'Yoked NaCl' rats: mean(FR1) vs 50%: $p=0.685$; mean(FR5) vs 50%: $p=0.990$). Indeed, yoked rats made as many NP in the active hole (NPa) as in the inactive hole (NPi) (Figure 1C: 'Yoked cocaine' rats: NPa vs NPi during FR1: $p=0.578$; NPa vs NPi during FR5: $p=0.909$; 'Yoked NaCl' rats: NPa vs NPi during FR1: $p=0.993$; NPa vs NPi during FR5: $p=0.992$), whereas rats that self-administered cocaine made much more NPa than NPi, especially in the FR5 schedule of reinforcement (Figure 1C: NPa vs NPi during FR1: $p<0.05$; NPa vs NPi during FR5: $p<0.001$). Taken together, these data confirm that the self-administering rats were the only ones associating NPs in the active hole with the cocaine injection. It is also worth noting that even at the end of the last session of cocaine self-administration, self-administering rats kept on making plenty of NPa during the time-out period, although these NPs were not reinforced by cocaine injections (Figure 1D).

Mecp2 protein, but not *Mecp2* mRNA, is induced by cocaine after the last session of cocaine self-administration.

To evaluate the effect of cocaine on gene expression, we compared rats receiving passive cocaine injections to rats receiving passive saline injections. Operant conditioning effect on gene expression was also assessed by comparing rats that self-administered cocaine to rats receiving passive cocaine injections. *Mecp2* expression was investigated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration, in following brain structures related to the reward system: the prefrontal cortex (PFCx), the caudate putamen (CPu) and the nucleus accumbens core (NAcC) and shell (NAcS). We found no difference in *Mecp2* mRNA level in none of the experimental groups (Figure 2A: $F_{(2,10)}=0.87$, $p=0.45$; Figure 2B: $F_{(2,9)}=0.21$, $p=0.81$), but there was a cocaine-related increase in *Mecp2* protein expression in the PFCx (Figure 3A: $F_{(2,9)}=9.48$, $p<0.01$; Yoked NaCl vs Yoked cocaine, $p<0.01$) and the CPu (Figure 3B: $F_{(2,10)}=14.83$, $p<0.005$; Yoked NaCl vs Yoked cocaine, $p<0.005$), but not in the NAc subregions (Figure 3C: $F_{(2,9)}=2.29$, $p=0.16$; Figure 3D: $F_{(2,10)}=0.14$, $p=0.87$). There was no difference in the number of *Mecp2* immunoreactive cells between rats receiving cocaine passively and self-administering rats, in none of the brain structures investigated. The data highlight an effect of cocaine, but not of operant conditioning, on *Mecp2* protein expression in the PFCx and the CPu.

HDAC2 expression is not modified by cocaine or by operant conditioning.

Since MeCP2 is able to recruit HDAC2 to induce chromatin remodeling and transcriptional repression, we also evaluated *HDAC2* expression in the same brain structures. Surprisingly, we did not observe any difference at the mRNA and protein level between any groups of rats, in none of the brain structures studied (Figure 4A: $F_{(2,8)}=3.95$, $p=0.06$; Figure 4B: $F_{(2,9)}=1.14$, $p=0.36$; Supplemental figure 1).

PP1C β gene expression is repressed by cocaine after the last session of cocaine self-administration.

We next investigated whether *PP1C β* expression could be differentially regulated by yoked cocaine vs cocaine self-administered voluntarily, similarly to *Mecp2*. *PP1C β* mRNA level was found to be highly repressed both in the PFCx (Figure 5A: $F_{(2,8)}=21.15$, $p<0.001$; Yoked NaCl vs Yoked cocaine, $p<0.001$) and the CPu (Figure 5B: $F_{(2,9)}=17.76$, $p<0.001$; Yoked

NaCl vs Yoked cocaine, $p < 0.001$) of rats receiving cocaine passively compared to saline-treated rats. Surprisingly, we did not observe any difference in *PP1C β* mRNA level between rats that self-administered cocaine and rats receiving cocaine injections passively, neither in the PFCx, nor in the CPu. We next verified that the decrease in *PP1C β* mRNA level was translated into repression at the protein level. As expected, we observed a decrease in the number of PP1C β immunoreactive cells in the PFCx (Figure 6A: $F_{(2,10)}=4.70$, $p < 0.05$; Yoked NaCl vs Yoked cocaine, $p < 0.05$) and the CPu (Figure 6B: $F_{(2,10)}=19.56$, $p < 0.0005$; Yoked NaCl vs Yoked cocaine, $p < 0.001$) of rats receiving cocaine passively compared to rats treated with the vehicle. No difference was noticed in PP1C β protein expression, neither in the NAcC, nor in the NAcS of these two groups of rats (Figure 6C: $F_{(2,10)}=0.89$, $p=0.44$; Figure 6D: $F_{(2,10)}=0.40$, $p=0.68$). As for *PP1C β* mRNA level, there was no effect of operant conditioning, since the number of PP1C β immunoreactive cells did not differ between the two groups of rats receiving cocaine, in none of the brain structures evaluated.

Food pellets operant self-administration

Rats that self-administered food pellets rapidly learned the operant conditioning task.

As for the cocaine operant self-administration experiment, rats that self-administered food pellets were first submitted to an FR1 schedule of reinforcement for 4 days, and then to an FR5 schedule for 6 days. Their performance was associated with the delivery of about 150 food pellets per day during the whole experiment, except for the first day of the FR1 and the FR5 schedules of reinforcement (Figure 7A: ‘Day’ effect: $F_{(9,90)}=46.03$, $p < 0.0001$; no ‘FR’ effect: FR1 vs FR5, $F_{(1,10)}=0.37$, $p=0.56$). This was due to the fact that they showed a strong preference for the active hole as soon as the first day of self-administration, their percentage of NP in the active hole (NP_a) being highly different from 50% (Figure 7B : %NP_a the 1st day of FR1 vs 50%: $p < 0.001$; mean(FR1) vs 50%: $p < 0.001$; mean(FR5) vs 50%: $p < 0.001$). They reached the acquisition criterion of 80% NP_a the first day of food pellets self-administration, much more rapidly than cocaine self-administering rats did (Figure 7B: %NP_a the 1st day vs 80%: $p < 0.005$; mean(FR1) vs 80%: $p < 0.001$; mean(FR5) vs 80%: $p < 0.001$; for comparison with ‘SA cocaine’ rats, see Figure 1B). On the contrary, no preference for one or the other hole was observed in both yoked groups, neither during the FR1, nor during the FR5 schedule of reinforcement, as their percentage of NP_a globally did not differ from 50% (Figure 7B:

‘Yoked pellets’ rats: mean(FR1) vs 50%: $p=0.175$; mean(FR5) vs 50%: $p=0.539$; ‘Yoked control’ rats: mean(FR1) vs 50%: $p=0.177$; mean(FR5) vs 50%: $p=0.066$). Indeed, yoked rats made as many NP in the active hole (NP_a) as in the inactive hole (NP_i) (Figure 7C: ‘Yoked pellets’ rats: NP_a vs NP_i during FR1: $p=0.941$; NP_a vs NP_i during FR5: $p=0.999$; ‘Yoked control’ rats: NP_a vs NP_i during FR1: $p=0.702$; NP_a vs NP_i during FR5: $p=0.999$), whereas rats performing food operant conditioning made much more NP_a than NP_i during both the FR1 and the FR5 schedules of reinforcement (Figure 7C: NP_a vs NP_i during FR1: $p<0.001$; NP_a vs NP_i during FR5: $p<0.001$). Surprisingly, unlike yoked rats from the cocaine self-administration experiment, yoked rats from the food pellets experiment made almost no NPs, neither in the active, nor in the inactive hole (Figure 7C; for comparison with ‘Yoked cocaine’ and ‘Yoked NaCl’ rats, see Figure 1C). It is difficult to explain such a difference; it might be due to a different environment (enclosure and basal noise) in the two experiments. Our data confirm that as for the cocaine self-administration experiment, the self-administering rats were the only ones associating NPs in the active hole with food pellets delivery. It is interesting to note that they limited their number of NP_a during the time-out period, especially after the switch from the FR1 to the FR5 schedule of reinforcement, since about 75% of their NP_a were made during the valid period (Figure 7D; for comparison with ‘SA cocaine’ rats, see Figure 1D).

Mecp2 protein, but not Mecp2 mRNA, is induced by operant conditioning after the last session of food pellets self-administration.

Mecp2 expression was investigated 24 h after the beginning of the last session of food pellets self-administration, in the same brain structures as those observed in the cocaine self-administration experiment. We found no difference in *Mecp2* mRNA level in none of the experimental groups (Figure 8A: $F_{(2,11)}=1.49$, $p=0.27$; Figure 8B: $F_{(2,8)}=3.76$, $p=0.07$). However, contrary to what we observed in the cocaine self-administration experiment, an increase in *Mecp2* protein expression related to operant conditioning could be noticed in all brain structures examined (Figure 9; for comparison with the cocaine self-administration experiment, see Figure 3). The increase concerned the number of *Mecp2* immunoreactive cells in food pellets self-administering rats compared to rats receiving food pellets passively, in the PFCx (Figure 9A: $F_{(2,11)}=11.24$, $p<0.005$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.05$), the CPU (Figure 9B: $F_{(2,12)}=10.37$, $p<0.005$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.005$), the NAcC (Figure 9C: $F_{(2,13)}=19.32$, $p<0.0005$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.001$) and the NAcS (Figure 9D:

$F_{(2,12)}=11.64$, $p<0.005$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.005$). There was no effect of food pellets reward on Mecp2 protein expression, since the number of Mecp2 immunoreactive cells did not differ between both groups of yoked rats, in none of the brain structures investigated. Thus, the effect of operant conditioning, but not of food reward, was correlated with Mecp2 protein expression (Figure 3 vs Figure 9).

HDAC2 expression is not modified by food reward or by operant conditioning.

As for the cocaine self-administration experiment, we also evaluated *HDAC2* expression in the same brain structures. We found no difference at the mRNA and protein level between any groups of rats, in none of the brain structures studied (Figure 10A: $F_{(2,8)}=0.30$, $p=0.75$; Figure 10B: $F_{(2,12)}=0.34$, $p=0.72$; Supplemental figure 2).

PP1C β gene expression is induced by operant conditioning after the last session of food pellets self-administration.

As for the cocaine self-administration experiment, we next investigated whether *PP1C β* expression could be differentially regulated by yoked food pellets delivery vs food pellets delivered voluntarily. We found that *PP1C β* mRNA level was induced in the CPu of self-administering rats compared to rats receiving food pellets passively (Figure 11B: $F_{(2,9)}=7.70$, $p<0.05$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.05$). A similar pattern was observed in the PFCx, even if significance was not reached, due to a high degree of variability in self-administering rats (Figure 11A: $F_{(2,11)}=2.47$, $p=0.13$). Contrary to the results obtained in the cocaine self-administration experiment, we did not observe any difference in *PP1C β* mRNA level between rats of the two yoked groups, neither in the PFCx, nor in the CPu, which suggests that *PP1C β* expression is not regulated by natural reward alone (Figure 5 vs Figure 11). We next evaluated *PP1C β* protein expression. As expected, an increase in the number of *PP1C β* immunoreactive cells was noticed in the PFCx (Figure 12A: $F_{(2,13)}=49.10$, $p<0.0001$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.0005$), the CPu (Figure 12B: $F_{(2,13)}=67.22$, $p<0.0001$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.0005$), the NAcC (Figure 12C: $F_{(2,13)}=50.22$, $p<0.0001$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.0005$) and the NAcS (Figure 12D: $F_{(2,13)}=39.11$, $p<0.0001$; SA pellets vs Yoked pellets, $p<0.0005$) of self-administering rats compared to rats receiving food pellets passively. In agreement with the messenger expression, food pellets reward alone did not translate into changes in the number of *PP1C β* immunoreactive cells in none of the brain

structures evaluated, since rats receiving food pellets passively did not differ from rats receiving no food pellets.

Discussion

In the present report, we compared the effects of passive cocaine injections with those of voluntary cocaine intake on *PP1C β* expression. We observed a cocaine-induced repression of *PP1C β* in the PFCx and the CPu, which was similar whatever the cocaine administration mode (passive vs self-administered). *PP1C β* repression inversely correlated with an increase in *Mecp2* expression in the same brain structures. A different pattern of expression was observed when food intake replaced cocaine intake, as *PP1C β* and *Mecp2* expression were increased by food operant self-administration, but not in response to passive food delivery, in the PFCx and throughout the striatum. Surprisingly, no difference was found on HDAC2 expression either with cocaine or with food, in none of the reward-related brain structures examined.

Our data comfort the cocaine-induced increase in *Mecp2* expression already reported (Cassel *et al.*, 2006; Im *et al.*, 2010; Host *et al.*, 2011) and suggest a dynamic time-related regulation of *Mecp2* expression: 24 h after the last session of operant self-administration, cocaine still increased *Mecp2* protein expression, a time at which *Mecp2* mRNA was no more induced. HDAC2 expression might also be dynamically regulated, thus explaining why cocaine induced HDAC2 mRNA and protein expression 2 h after the last session of cocaine self-administration (Host *et al.*, 2011), whereas no increase was observed neither 15 h (Cassel *et al.*, 2006), nor 24 h after the last cocaine intake (present study).

Interestingly, the cocaine-induced *Mecp2* expression was in phase with a decrease in *PP1C β* expression. As demonstrated previously, chronic cocaine treatment repressed *PP1C β* expression through DNA methylation and *Mecp2* binding. The down-regulation we observed in both groups of rats receiving cocaine therefore strongly suggests that it results from cocaine-induced hypermethylation of the *PP1C β* gene followed by increased *Mecp2* binding. Contrary to what we observed upon cocaine intake, *Mecp2* and *PP1C β* protein expression were both increased in rats that self-administered food pellets compared to rats receiving food pellets passively. A possible explanation for that is that it may result from a demethylation of the *PP1C β* gene. However, the mechanism of demethylation remains to be described.

The increase in *Mecp2* and *PP1C β* we observed in rats that self-administered food pellets reveals a role of the genes in food operant conditioning expression, in agreement with

previous studies highlighting the involvement of MeCP2 (Moretti *et al.*, 2006; Pelka *et al.*, 2006; Stearns *et al.*, 2007; Na *et al.*, 2012) and PP1 (Genoux *et al.*, 2002; Miller and Sweatt, 2007; Koshibu *et al.*, 2009 and 2011; Gräff *et al.*, 2010) in learning and memory processes. On the opposite, neither *Mecp2* nor *PP1C β* levels were modified by cocaine operant conditioning compared to passive cocaine injections, suggesting that both *Mecp2* and *PP1C β* involvement in learning and memory mechanisms was altered by cocaine. Interestingly, unlike rats that self-administered food pellets, cocaine self-administering rats made many NPa during time-out periods. This may result from cocaine-induced impulsivity, locomotor hyperactivity and/or stereotypies, but could also represent difficulties of these rats to adapt their behavior. Cocaine exposure is indeed known to decrease behavioral flexibility (Stalnaker *et al.*, 2007 and 2009; van Holst and Schilt, 2011). The lack of *PP1C β* induction in cocaine self-administering rats, as opposed to rats that self-administered food pellets, could prevent the behavioral switch from an initial associative learning (NPa trigger cocaine injection) to a more appropriate one (NPa during the valid period trigger cocaine injection). Thus, our data support the concept that addiction is, at least in part, a learning disorder (Di Chiara, 1999; Hyman, 2005). Considering the fact that our study is based on operant conditioning, it would however be of great interest to enlarge our investigations to the amygdala and the hippocampus, two brain structures particularly involved in this behavioral task.

Our data provide another evidence for a differential regulation between drugs of abuse and natural rewards. It has already been shown that cocaine, but not sucrose or food operant self-administration induced persistent long-term potentiation in the ventral tegmental area (Chen *et al.*, 2008). In the same line, repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affected cocaine but not natural reinforcement (Levy *et al.*, 2007), suggesting specific neuroadaptations triggered by drugs of abuse as compared to natural rewards. This is also supported by the fact that treatment with an HDAC inhibitor decreased cocaine self-administration but not sucrose self-administration (Romieu *et al.*, 2008). Interestingly, we found that repeated cocaine exposure only affected *Mecp2* and *PP1C β* expression in the CPU region of the striatum, suggesting a ‘dorsalization’ of the striatal regions involved in drugs of abuse effects (Porrino *et al.*, 2004 and 2007; Everitt and Robbins, 2005) as opposed to natural rewards, which could therefore underlie the development of cocaine-related habits. This also strengthens the proposal that distinct circuits underlie drugs of abuse and natural rewards (Carelli *et al.*, 2000). To better define the respective neural circuits involved in drugs of abuse vs food effects, it would be important to measure gene expression in ventromedial and lateral

nuclei of the hypothalamus, which are known to analyze satiety and hunger and to regulate food intake, together with the arcuate nucleus. Interestingly, the hypothalamus is interconnected with the reward system and participates to the modulation of drugs of abuse intake, since the hypothalamic orexin/hypocretin neurons have been shown to be involved in drug reward-seeking (Aston-Jones *et al.*, 2010; Cason *et al.*, 2010).

In conclusion, our data confirm that cocaine regulates *Mecp2* and *PP1C β* expression. We demonstrate that *Mecp2* and *PP1C β* were both involved in learning and memory processes, since the expression of both genes was induced by food operant conditioning. This effect was not found with cocaine, as *PP1C β* was similarly repressed in yoked and self-administering animals. Since PP1 is considered as a memory-suppressor gene, its repression by cocaine could favor selective memories and thus contribute to monomaniac behaviors observed with repeated cocaine exposure. *Mecp2* and *PP1C β* being differentially regulated by cocaine and food, our results also provide another evidence for a differential regulation induced by drugs of abuse and natural rewards.

REFERENCES

- Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, *et al* (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res* **1314**: 74-90.
- Caine SB, Lintz R, Koob GF (1993). Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: Behavioral neuroscience: a practical approach (Sahgal A, ed), pp 117-143. Oxford: Oxford UP.
- Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ (2000). Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *J Neurosci* **20**(11): 4255-4266.
- Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010). CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol Dis* **38**(3): 414-424.
- Cason AM, Smith RJ, Tahsili-Fahadan P, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G (2010). Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. *Physiol Behav* **100**(5): 419-428.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, *et al* (2006). Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* **70**(2): 487-492.
- Ceulemans H, Bollen M (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* **84**(1): 1-39.
- Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, *et al* (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**(2): 288-297.
- Colbran RJ (2004). Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* **24**(39): 8404-8409.
- Di Chiara G (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol*. **375**(1-3): 13-30.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**(11): 1481-1489.
- Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* **418**(6901): 970-975.
- Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* **91**(2): 603-649.
- Graff J, Koshibu K, Jouvenceau A, Dutar P, Mansuy IM (2010). Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity. *Learn Mem* **17**(7): 355-363.
- Host L, Anglard P, Romieu P, Thibault C, Dembele D, Aunis D, *et al* (2010). Inhibition of histone deacetylases in rats self-administering cocaine regulates lissencephaly gene-1 and reelin gene expression, as revealed by microarray technique. *J Neurochem* **113**(1): 236-247.
- Host L, Dietrich JB, Carouge D, Aunis D, Zwiller J (2011). Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *J Psychopharmacol* **25**(2): 222-229.
- Hyman SE (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* **162**(8): 1414-1422.

- Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010). MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* **13**(9): 1120-1127.
- Jouvert P, Revel MO, Lazaris A, Aunis D, Langley K, Zwiller J (2004). Activation of the cGMP pathway in dopaminergic structures reduces cocaine-induced EGR-1 expression and locomotor activity. *J Neurosci* **24**(47): 10716-10725.
- Koshibu K, Graff J, Beullens M, Heitz FD, Berchtold D, Russig H, *et al* (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* **29**(41): 13079-13089.
- Koshibu K, Graff J, Mansuy IM (2011). Nuclear protein phosphatase-1: an epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation. *Neuroscience* **173**: 30-36.
- LeSage MG, Stafford D, Glowa JR (1999). Preclinical research on cocaine self-administration: environmental determinants and their interaction with pharmacological treatment. *Neurosci Biobehav Rev* **23**(5): 717-741.
- Levy D, Shabat-Simon M, Shalev U, Barnea-Ygael N, Cooper A, Zangen A (2007). Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not "natural" reinforcement. *J Neurosci* **27**(51): 14179-14189.
- Ludwig MG, Basset P, Anglard P (2000). Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* **275**(51): 39981-39990.
- Maze I, Nestler EJ (2011). The epigenetic landscape of addiction. *Ann N Y Acad Sci* **1216**: 99-113.
- Miller CA, Sweatt JD (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* **53**(6): 857-869.
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, *et al* (2006). Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* **26**(1): 319-327.
- Munton RP, Vizi S, Mansuy IM (2004). The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett* **567**(1): 121-128.
- Na ES, Nelson ED, Adachi M, Autry AE, Mahgoub MA, Kavalali ET, *et al* (2012). A mouse model for MeCP2 duplication syndrome: MeCP2 overexpression impairs learning and memory and synaptic transmission. *J Neurosci* **32**(9): 3109-3117.
- Pelka GJ, Watson CM, Radziewicz T, Hayward M, Lahooti H, Christodoulou J, *et al* (2006). Mecp2 deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* **129**(Pt 4): 887-898.
- Porrino LJ, Lyons D, Smith HR, Daunais JB, Nader MA (2004). Cocaine self-administration produces a progressive involvement of limbic, association, and sensorimotor striatal domains. *J Neurosci* **24**(14): 3554-3562.
- Porrino LJ, Smith HR, Nader MA, Beveridge TJ (2007). The effects of cocaine: a shifting target over the course of addiction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**(8): 1593-1600.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* **12**(11): 623-637.
- Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008). Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci* **28**(38): 9342-9348.
- Stalnaker TA, Roesch MR, Calu DJ, Burke KA, Singh T, Schoenbaum G (2007). Neural correlates of inflexible behavior in the orbitofrontal-amygdalar circuit after cocaine exposure. *Ann N Y Acad Sci* **1121**: 598-609.

Stalnaker TA, Takahashi Y, Roesch MR, Schoenbaum G (2009). Neural substrates of cognitive inflexibility after chronic cocaine exposure. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 63-72.

Stearns NA, Schaevitz LR, Bowling H, Nag N, Berger UV, Berger-Sweeney J (2007). Behavioral and anatomical abnormalities in Mecp2 mutant mice: a model for Rett syndrome. *Neuroscience* **146**(3): 907-921.

van Holst RJ, Schilt T (2011). Drug-related decrease in neuropsychological functions of abstinent drug users. *Curr Drug Abuse Rev* **4**(1): 42-56.

FIGURES

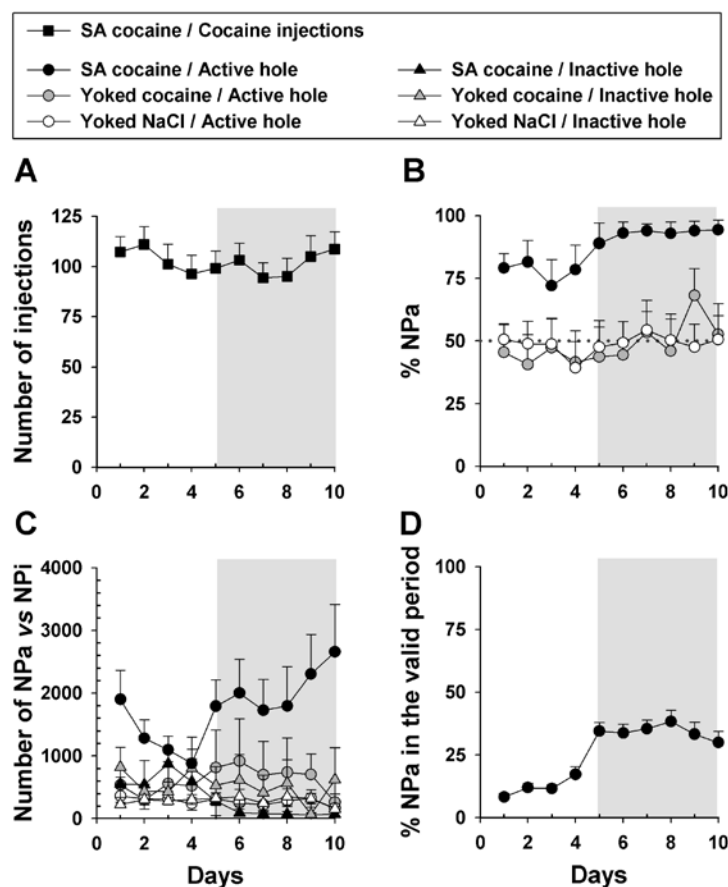


Figure 1: Cocaine operant self-administration experiment. (A) Number of cocaine injections self-administered by ‘SA cocaine’ rats. The white area materializes the FR1 schedule of reinforcement, whereas the grey area materializes the FR5 schedule of reinforcement. (B) Percentage of Nosepokes in the active hole (NPa). Chance level is represented by a dotted line at 50% NPa. (C) Number of Nosepokes in the active hole (NPa) and in the inactive hole (NPi). NPa are represented with circles, and NPi, with triangles. (D) Percentage of Nosepokes in the active hole (NPa) performed during the valid period. Data represent the mean \pm SEM, n = 8-10 per group.

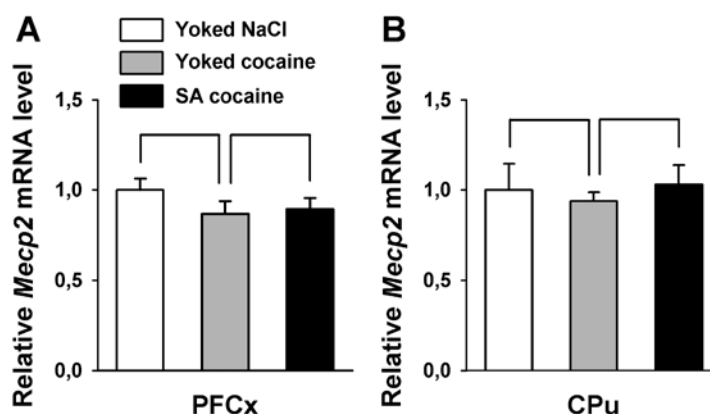


Figure 2: *Mecp2* expression in the prefrontal cortex and the caudate putamen of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. The effect of cocaine vs saline on *Mecp2* expression was investigated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by comparing ‘Yoked cocaine’ to ‘Yoked NaCl’ rats. The effect of voluntary cocaine taking vs yoked cocaine was also investigated by comparing ‘SA cocaine’ to ‘Yoked cocaine’ rats. Cocaine- and operant conditioning-related effects on *Mecp2* mRNA level were evaluated by quantitative RT-PCR (A) in the medial part of the prefrontal cortex (PFCx) and (B) in the caudate putamen (CPu). The amount of *Mecp2* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Data represent the mean \pm SEM, $n = 3-5$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA.

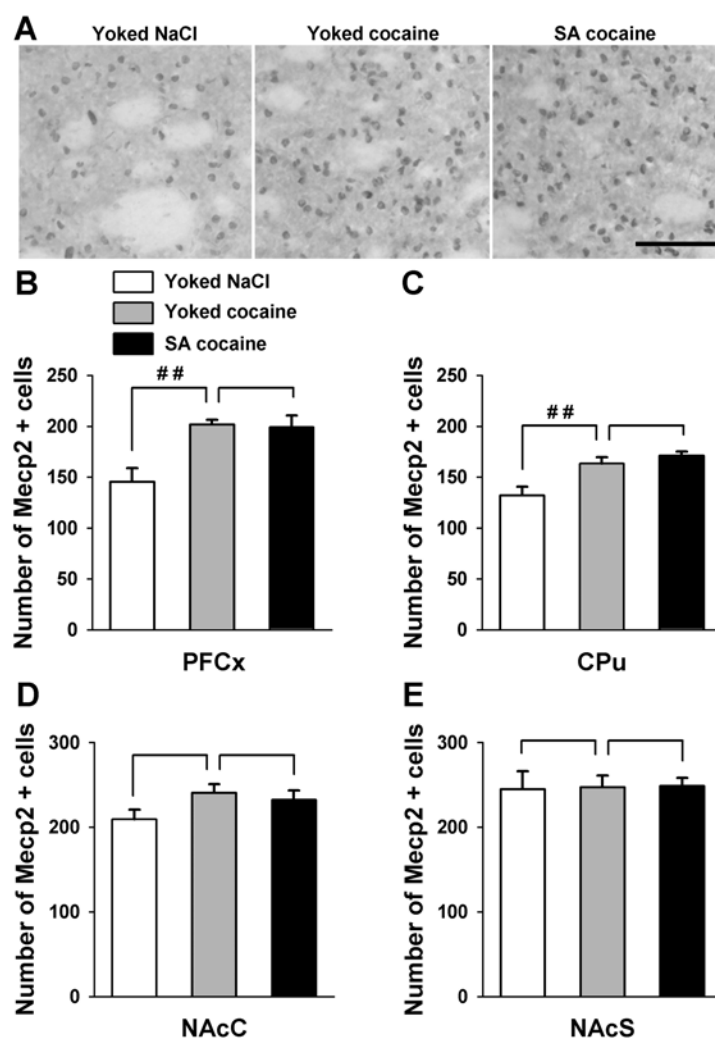


Figure 3: *Mecp2* protein expression in the major brain structures of the reward system of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. Cocaine- and operant conditioning-related effects on *Mecp2* protein expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by immunohistochemistry with an antibody directed against *Mecp2*. (A) Immunohistochemistry of *Mecp2* in the caudate putamen (CPu). Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m. Quantification of *Mecp2* immunoreactivity was carried in (B) the prefrontal cortex (PFCx), (C) the CPu, (D) the nucleus accumbens core (NAcC) and (E) the nucleus accumbens shell (NAcS) of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. Data represent the mean \pm SEM, n = 4-5 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. ## p<0.01.

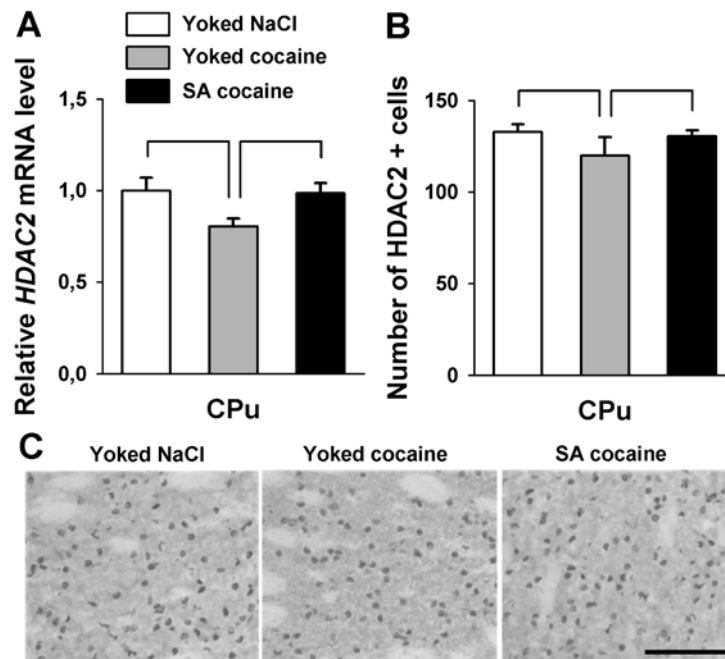


Figure 4: *HDAC2* expression in the caudate putamen of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. Cocaine- and operant conditioning-related effects on HDAC2 expression were evaluated in the caudate putamen (CPu) 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration (A) by quantitative RT-PCR and (B) by immunohistochemistry. Concerning RT-qPCR, the amount of *HDAC2* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Immunohistochemistry was performed with an antibody directed against HDAC2. Quantification of HDAC2 immunoreactivity in the CPu is represented. Data represent the mean \pm SEM, $n = 3-4$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA. (C) Immunohistochemistry of HDAC2 in the CPu. Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m.

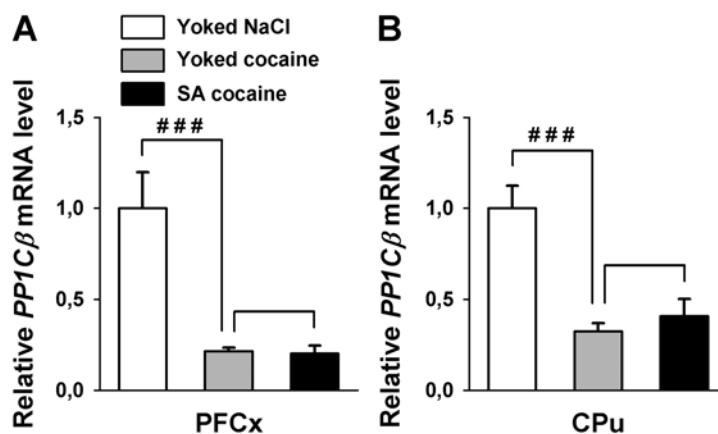


Figure 5: *PP1Cβ* expression in the prefrontal cortex and the caudate putamen of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. Cocaine- and operant conditioning-related effects on *PP1Cβ* mRNA level were evaluated by quantitative RT-PCR, 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration, (A) in the medial part of the prefrontal cortex (PFCx) and (B) in the caudate putamen (CPu) of ‘Yoked NaCl’, ‘Yoked cocaine’ and ‘SA cocaine’ rats. The amount of *PP1Cβ* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Data represent the mean \pm SEM, n = 3-5 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. ### p<0.001.

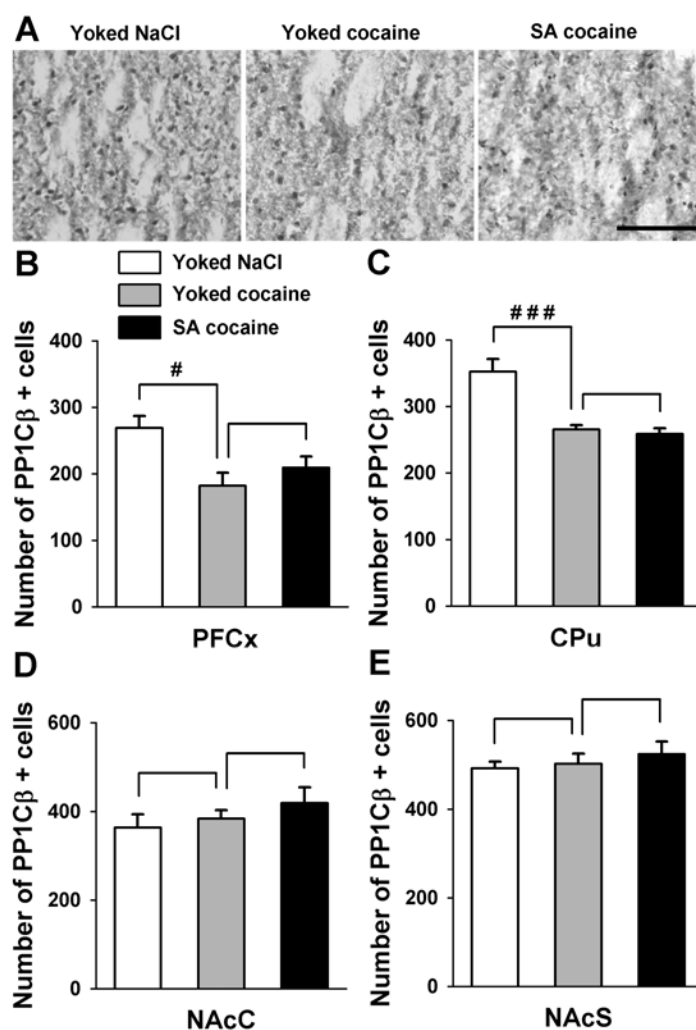


Figure 6: *PP1C β protein expression in the major brain structures of the reward system of 'Yoked NaCl', 'Yoked cocaine' and 'SA cocaine' rats.* Cocaine- and operant conditioning-related effects on PP1C β protein expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by immunohistochemistry with an antibody directed against PP1C β . **(A)** Immunohistochemistry of PP1C β in the caudate putamen (CPu). Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m. Quantification of PP1C β immunoreactivity was carried in **(B)** the prefrontal cortex (PFCx), **(C)** the CPu, **(D)** the nucleus accumbens core (NAcC) and **(E)** the nucleus accumbens shell (NAcS) of 'Yoked NaCl', 'Yoked cocaine' and 'SA cocaine' rats. Data represent the mean \pm SEM, n = 4-5 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. # p<0.05, ### p<0.001.

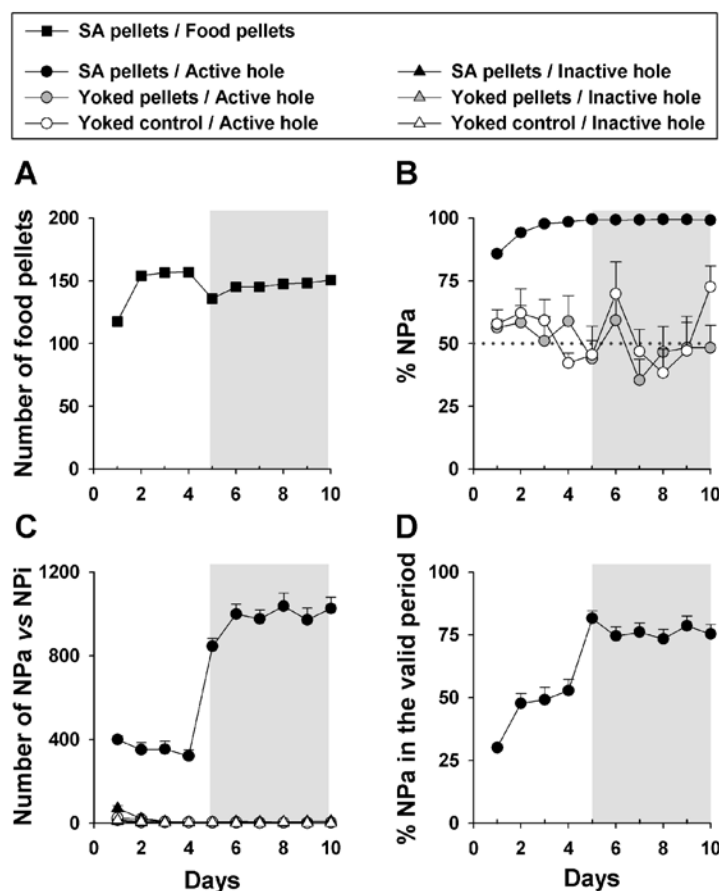


Figure 7: Food pellets operant self-administration experiment. (A) Number of food pellets delivered to ‘SA pellets’ rats. The white area materializes the FR1 schedule of reinforcement, whereas the grey area materializes the FR5 schedule of reinforcement. (B) Percentage of Nosepokes in the active hole (NPa). Chance level is represented by a dotted line at 50% NPa. (C) Number of Nosepokes in the active hole (NPa) and in the inactive hole (NPi). NPa are represented with circles, and NPi, with triangles. (D) Percentage of Nosepokes in the active hole (NPa) performed during the valid period. Data represent the mean \pm SEM, $n = 8-12$ per group.

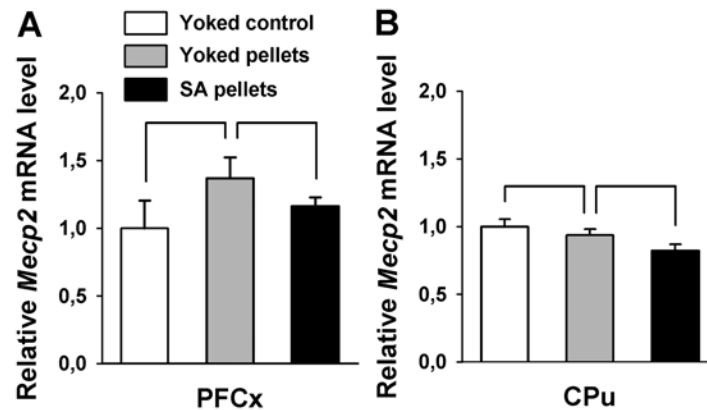


Figure 8: *Mecp2* expression in the prefrontal cortex and the caudate putamen of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on *Mecp2* mRNA level were evaluated by quantitative RT-PCR, 24 h after the beginning of the last session of food pellets self-administration, (A) in the medial part of the prefrontal cortex (PFCx) and (B) in the caudate putamen (CPu) of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. The amount of *Mecp2* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Data represent the mean \pm SEM, $n = 3-6$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA.

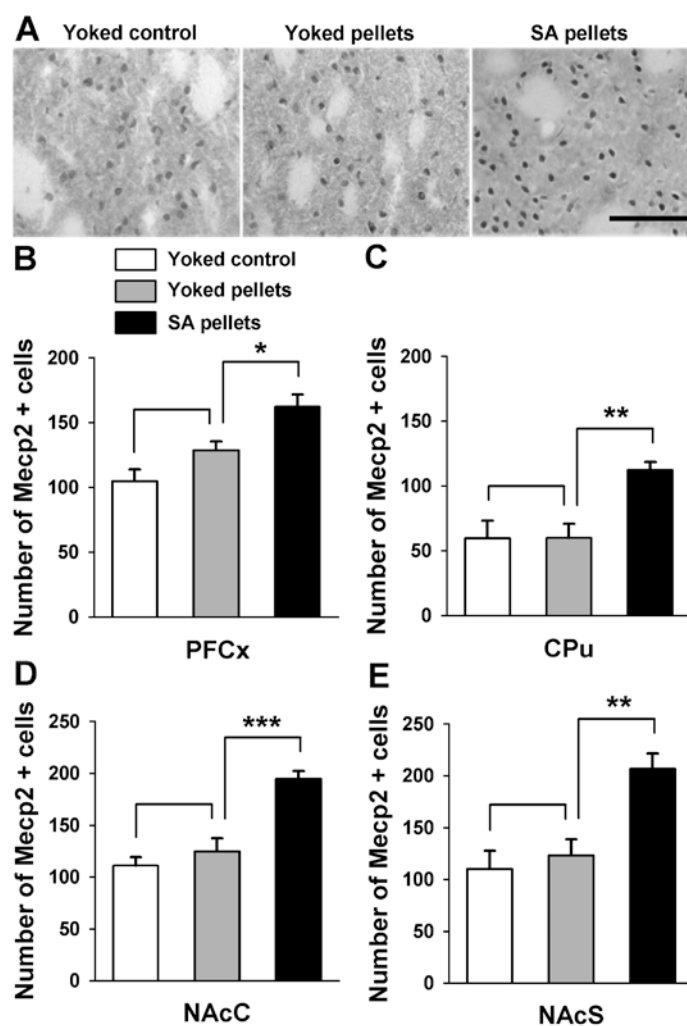


Figure 9: *Mecp2* protein expression in the major brain structures of the reward system of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on *Mecp2* protein expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by immunohistochemistry with an antibody directed against *Mecp2*. (A) Immunohistochemistry of *Mecp2* in the caudate putamen (CPu). Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m. Quantification of *Mecp2* immunoreactivity was carried in (B) the prefrontal cortex (PFCx), (C) the CPu, (D) the nucleus accumbens core (NAcC) and (E) the nucleus accumbens shell (NAcS) of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Data represent the mean \pm SEM, n = 4-6 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

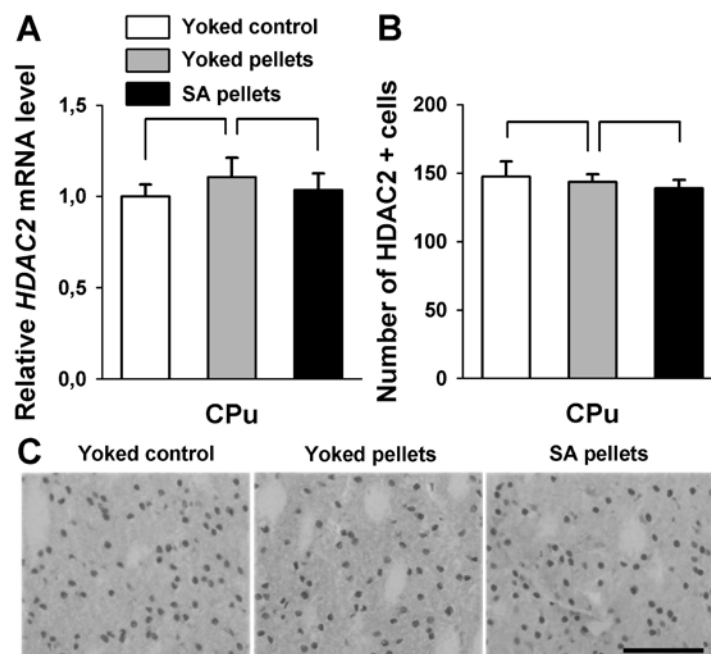


Figure 10: HDAC2 expression in the caudate putamen of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on HDAC2 expression were evaluated in the caudate putamen (CPu) 24 h after the beginning of the last session of food pellets self-administration (A) by quantitative RT-PCR and (B) by immunohistochemistry. Concerning RT-qPCR, the amount of *HDAC2* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Immunohistochemistry was performed with an antibody directed against HDAC2. Quantification of HDAC2 immunoreactivity in the CPu is represented. Data represent the mean \pm SEM, $n = 3-6$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA. (C) Immunohistochemistry of HDAC2 in the CPu. Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m.

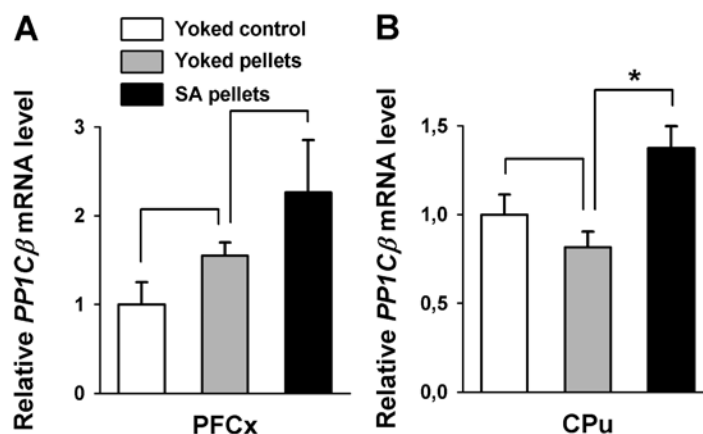


Figure 11: *PP1Cβ* expression in the prefrontal cortex and the caudate putamen of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on *PP1Cβ* mRNA level were evaluated by quantitative RT-PCR, 24 h after the beginning of the last session of food pellets self-administration, (A) in the medial part of the prefrontal cortex (PFCx) and (B) in the caudate putamen (CPu) of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. The amount of *PP1Cβ* transcript was normalized to that of *36B4* mRNA. Data represent the mean \pm SEM, n = 3-5 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. * p<0.05.

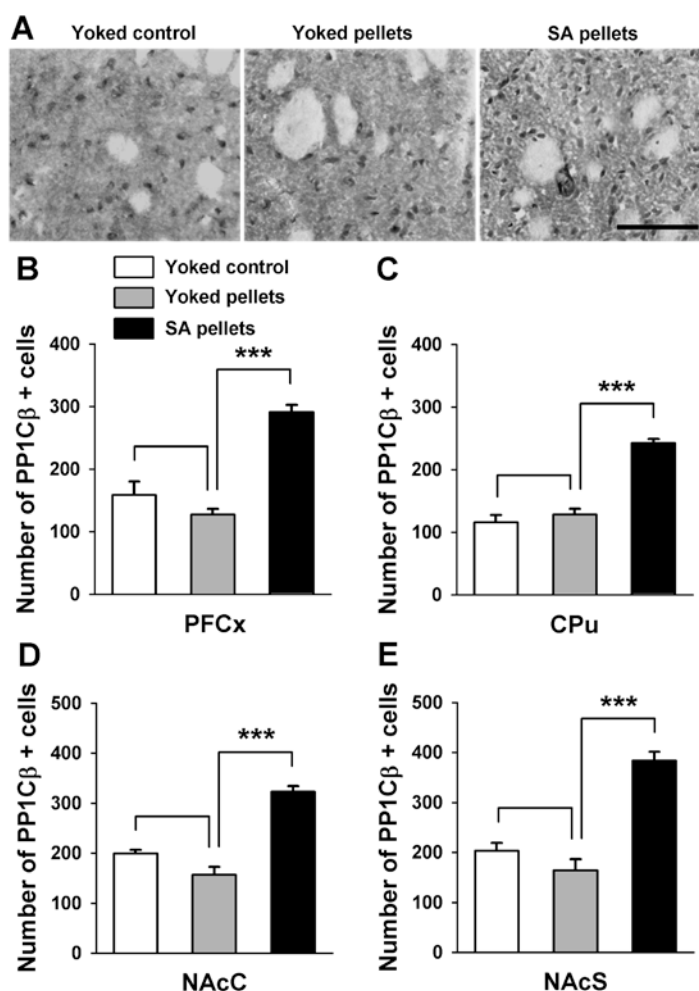
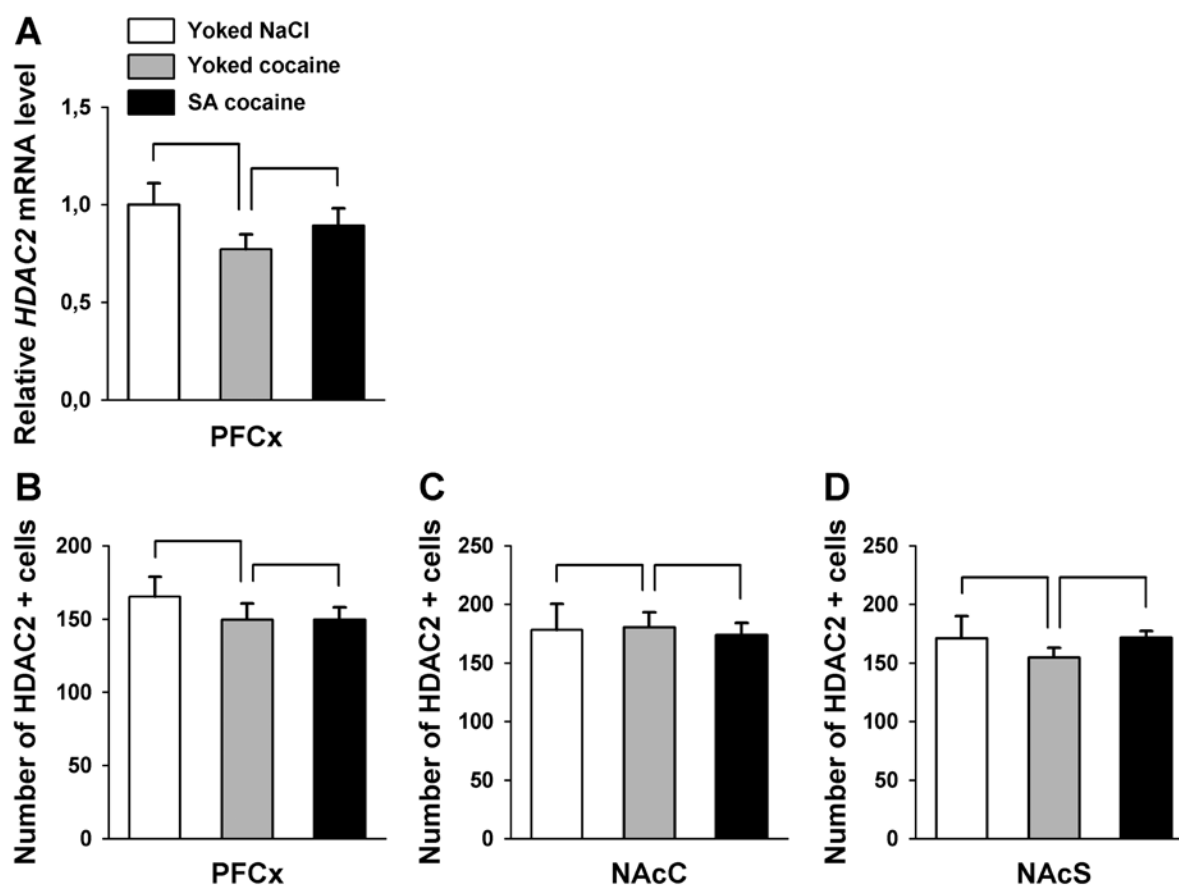
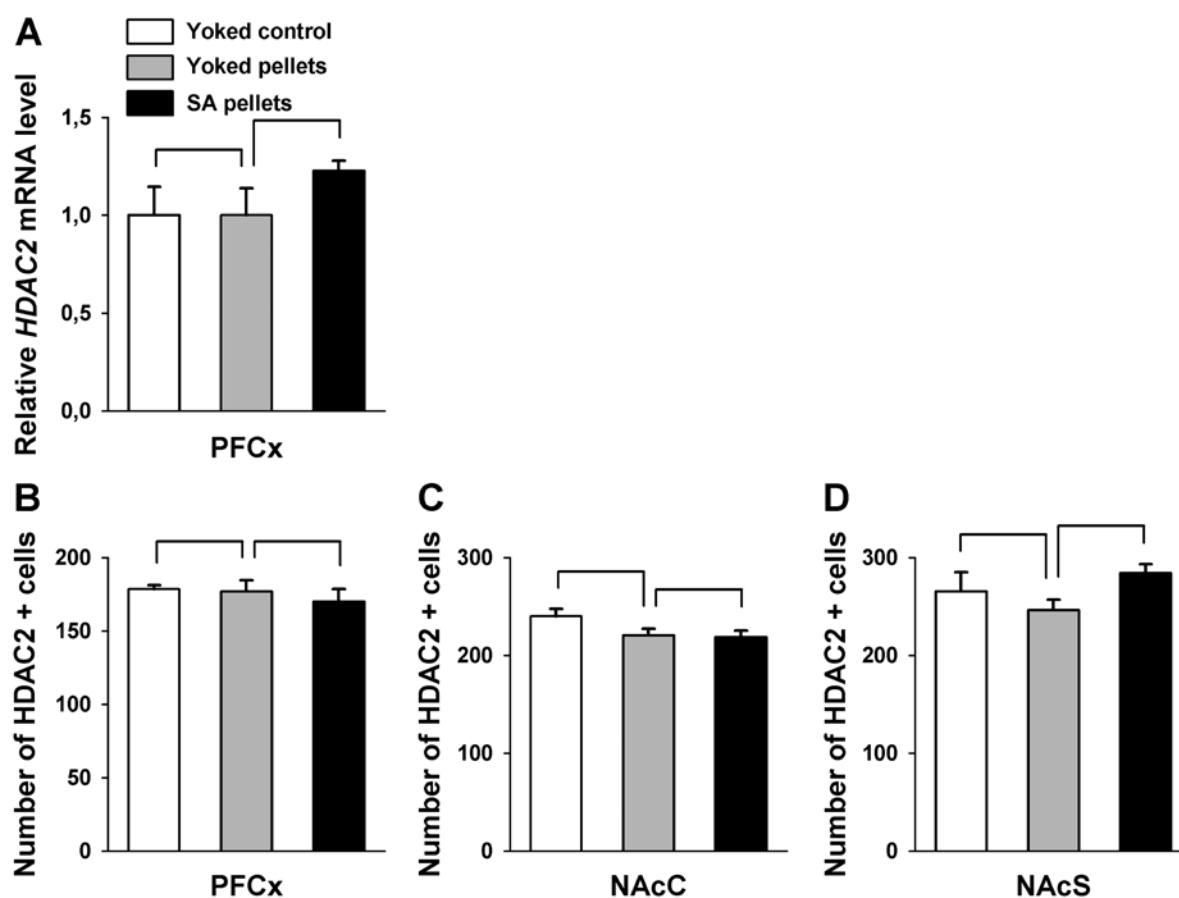


Figure 12: PP1C β protein expression in the major brain structures of the reward system of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on PP1C β protein expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of food pellets self-administration by immunohistochemistry with an antibody directed against PP1C β . (A) Immunohistochemistry of PP1C β in the caudate putamen (CPu). Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m. Quantification of PP1C β immunoreactivity was carried in (B) the prefrontal cortex (PFCx), (C) the CPu, (D) the nucleus accumbens core (NAcC) and (E) the nucleus accumbens shell (NAcS) of ‘Yoked control’, ‘Yoked pellets’ and ‘SA pellets’ rats. Data represent the mean \pm SEM, n = 4-6 per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA followed by Neuwman-Keuls post-hoc, when required. *** p<0.001.



Supplemental Figure 1: HDAC2 expression in brain structures involved in reward of 'Yoked NaCl', 'Yoked cocaine' and 'SA cocaine' rats. Cocaine- and operant conditioning-related effects on HDAC2 expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by quantitative RT-PCR and by immunohistochemistry. (A) The amount of *HDAC2* transcript was evaluated in the prefrontal cortex (PFCx) and was normalized to that of *36B4* mRNA. Immunohistochemistry was performed with an antibody directed against HDAC2. Quantification of HDAC2 immunoreactivity was carried in (B) the PFCx, (C) the nucleus accumbens core (NAcC) and (D) the nucleus accumbens shell (NAcS). Data represent the mean \pm SEM, $n = 3-5$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA.



Supplemental Figure 2: HDAC2 expression in brain structures involved in reward of 'Yoked control', 'Yoked pellets' and 'SA pellets' rats. Food reward- and operant conditioning-related effects on HDAC2 expression were evaluated 24 h after the beginning of the last session of cocaine self-administration by quantitative RT-PCR and by immunohistochemistry. (A) The amount of *HDAC2* transcript was evaluated in the prefrontal cortex (PFCx) and was normalized to that of *36B4* mRNA. Immunohistochemistry was performed with an antibody directed against HDAC2. Quantification of HDAC2 immunoreactivity was carried in (B) the PFCx, (C) the nucleus accumbens core (NAcC) and (D) the nucleus accumbens shell (NAcS). Data represent the mean \pm SEM, $n = 4-6$ per group. Statistical analysis performed was one-way ANOVA.

DISCUSSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

I. Différentes isoformes de PP1, différents rôles dans la biologie cellulaire

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les mammifères possèdent trois gènes PP1, qui codent les sous-unités catalytiques α , β et γ_1/γ_2 , ces deux dernières sous-unités étant générées par épissage alternatif du gène *PP1C γ* . Il est important de rappeler que les sous-unités catalytiques de PP1 n'existent pas à l'état libre dans les cellules, mais associées à un grand nombre de partenaires régulateurs (Bollen et Stalmans, 1992 ; Hubbard et Cohen, 1993 ; Moorhead et coll., 2007 ; Virshup et Shenolikar, 2009), formant ainsi potentiellement une grande variété d'holoenzymes multimériques. Néanmoins, PP1 est généralement considérée comme une seule entité. En effet, l'étude des processus cellulaires dans lesquels PP1 est impliquée est principalement réalisée avec des souris transgéniques ou des inhibiteurs pharmacologiques, et bien que ces études aient démontré l'implication et le rôle de PP1 dans un grand nombre de processus cellulaires, elles ne permettent pas d'identifier la sous-unité catalytique, et plus largement l'holoenzyme multimérique PP1, mise en jeu.

Dans ce contexte, nos données indiquent une régulation différentielle des gènes codant chacune des sous-unités catalytiques de PP1. Nous avons en effet montré que *PP1C β* (article 1), tout comme *PP1C γ* (Anier et coll., 2010), est régulée au niveau de la transcription par un

mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN et de la liaison de MeCP2, ce qui n'est pas le cas de *PP1C α* , dont l'expression ne varie ni en réponse à un traitement à un agent déméthylant (5-aza-2'déoxycytidine), ni dans les structures cérébrales des souris *Mecp2*^{308/Y} (article 1). Nous avons par ailleurs montré que l'expression de *PP1C β* est fortement réprimée par la sérotonine, alors que celle de *PP1C α* est induite par ce même traitement (article 1). En accord avec le fait que le système sérotoninergique sous-tend une partie des effets de la cocaïne, et que l'expression de MeCP2 soit induite par la cocaïne et la fluoxétine (Cassel et coll., 2006), *PP1C β* est également réprimé par la cocaïne (articles 1 et 2), tout comme *PP1C γ* (Anier et coll., 2010). A l'inverse, l'expression de *PP1C α* n'est pas modulée par la cocaïne, et ce, que ce soit 5, 10 ou 15 h après la dernière injection de cocaïne (article 1). Ces données indiquent que seuls les gènes *PP1C β* et *PP1C γ* (Anier et coll., 2010) sont différenciellement régulés par la cocaïne et participeraient donc aux effets de la cocaïne.

Il est intéressant de noter par ailleurs que l'expression de *PP1C β* n'est réprimée par la cocaïne que suite à un traitement chronique (article 1), alors que la répression de *PP1C γ* est déjà observée suite à une injection unique (Anier et coll., 2010). Ainsi, les effets d'un traitement aigu à la cocaïne seraient en partie sous-tendus par *PP1C γ* 1, alors qu'une prise répétée de cocaïne impliquerait la mise en jeu des sous-unités β et γ 1. En outre, bien que ces deux sous-unités participent aux effets à long-terme de la cocaïne, il semble peu probable qu'elles jouent des rôles similaires.

En effet, si l'ensemble des isoformes de PP1 est exprimé dans l'encéphale de mammifères (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999), les sous-unités α , β et γ 1 présentent une localisation cellulaire et subcellulaire différentielle, la sous-unité γ 2 étant essentiellement exprimée dans les testicules (da Cruz e Silva et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999 ; Moorhead et coll., 2007). La liaison des sous-unités *PP1C α* et *C γ 1* aux complexes spinophiline/neurabine leur confère par exemple une localisation préférentielle au niveau des épines dendritiques, et notamment au niveau des densités post-synaptiques (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999 ; Muly et coll., 2001 ; Bordelon et coll., 2005), alors que *PP1C β* est essentiellement localisée au niveau de la périphérie du soma des cellules et dans les principales dendrites (Strack et coll., 1999), celle-ci étant recrutée au niveau des microtubules par la protéine tau (Liao et coll., 1998). Le recrutement des sous-unités de PP1 au sein de compartiments cellulaires différents leur confère de ce fait une spécificité de substrats en

accord avec l'idée que chacune des sous-unités catalytiques de PP1 régule des processus cellulaires distincts.

Au vu de nos résultats, il semble donc important de chercher à identifier la ou les sous-unités catalytiques de PP1 impliquée(s) dans les processus cellulaires étudiés. Bien que celles-ci possèdent une forte homologie de séquence, leurs extrémités terminales présentent une variabilité de séquence permettant la conception d'amorces nucléotidiques ou d'anticorps spécifiques (da Cruz e Silva et coll., 1995 ; Lin et coll., 1999 ; Strack et coll., 1999) pour l'analyse de l'expression de chacune des trois sous-unités catalytiques de PP1.

II. PP1, méthylation de l'ADN et cocaïne

Nous avons vu au cours de l'introduction que la méthylation de l'ADN a exclusivement lieu, chez les vertébrés, au niveau des dinucléotides CpG (Coulondre et coll., 1878 ; Bird, 1980). Bien que les dinucléotides CpG soient répartis sur l'ensemble du génome, on note des régions CpG riches appelées 'îlots CpG'. On dénombre environ 25 000 îlots CpG dans l'ensemble du génome humain, dont plus de la moitié est localisée au niveau de promoteurs de gènes connus, et plus particulièrement autour du site d'initiation de la transcription (Illingworth et coll., 2010). C'est le cas des sous-unités α , β , et γ qui présentent toutes les trois un îlot CpG dans la région promotrice de leur gène.

A. Méthylation des îlots CpG

Comme nous l'avons vu dans le premier paragraphe, le gène de la sous-unité α de PP1 ne semble pas régulé par un mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN (article 1), indiquant l'absence de méthylation au niveau de son îlot CpG, comme c'est le cas pour une majorité de gènes. En effet, en conditions non pathologiques, la méthylation de l'ADN est essentiellement observée en dehors des îlots CpG, ceux-ci étant majoritairement non-méthylés (pour revues : Deaton et Bird, 2011 ; Jones, 2012).

Ceci pourrait être dû à la mise en jeu conjointe de différents mécanismes. Il semblerait qu'une déméthylation active de ces îlots notamment *via* la protéine Tet (Ito et coll., 2010 ; Wu

et Zhang, 2010 ; Ficz et coll., 2011 ; Wu et coll., 2011), associée à la liaison de facteurs de transcription comme Sp1 (Brandeis et coll., 1994 ; Macleod et coll., 1994) et à une transcription active (Sequeira-Mendes et coll., 2009 ; Takeshima et coll., 2009) empêche la méthylation des îlots CpG. La triméthylation de la Lys 4 de l'histone H3 (H3K4me3) favoriserait également la non-méthylation des îlots CpG, cette marque épigénétique interférant avec l'activité DNMT (Ooi et coll., 2007). Il a en effet été montré que la DNMT3L, un régulateur inactif au niveau enzymatique, reconnaît la queue de l'histone H3, uniquement lorsque celle-ci est non méthylée au niveau de la Lys 4, et induit alors la méthylation *de novo* de l'ADN en recrutant et/ou en activant la DNMT3A.

Il serait intéressant de vérifier ces mécanismes en évaluant le degré d'occupation de l'îlot CpG de *PPICα* par la protéine Tet, en utilisant la technique d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) avec un anticorps dirigé contre la protéine Tet et des amorces nucléotidiques spécifiques localisées au niveau de l'îlot CpG de *PPICα*. Cette étude pourrait être complétée par une immunoprécipitation d'ADN avec un anticorps dirigé contre les 5-hydroxyméthylcytosines, qui nous permettrait d'évaluer le degré d'hydroxyméthylation de cette région par la protéine Tet, première étape du processus de déméthylation active (pour revue : Bhutani et coll., 2011). Le degré de méthylation pourrait être étudié en parallèle, par la technique d'immunoprécipitation d'ADN avec un anticorps dirigé cette fois contre les 5-méthylcytosines. Enfin, la présence de la marque épigénétique H3K4me3 au niveau de l'îlot CpG de *PPICα* pourrait également être mise en évidence, par une expérience de ChIP avec un anticorps spécifique anti-H3K4me3.

Nous avons à l'opposé montré que le gène *PPICβ* (article 1), tout comme le gène *PPICγ* (Anier et coll., 2010), est régulé par méthylation de l'ADN au niveau de l'îlot CpG du promoteur. Bien que la majorité des îlots CpG localisés au niveau des promoteurs de gènes soit non-méthylée, il est largement décrit dans la littérature que certains îlots CpG sont méthylés, notamment au cours du développement, ce qui conduit à la répression stable de l'expression des gènes associés (Stein et coll., 1982 ; Mohn et coll., 2008 ; Payer et Lee, 2008), les exemples les plus connus étant les gènes à empreinte parentale ou encore les gènes du chromosome X inactivé chez la femelle. Ces données ont d'ailleurs conduit à considérer la méthylation de l'ADN comme une marque de répression transcriptionnelle stable et robuste. Or, nous avons observé une méthylation dynamique du gène *PPICβ*, induite par la cocaïne, confirmant que les profils de méthylation de certains îlots CpG situés au niveau des

promoteurs de gènes peuvent au contraire être régulés par l'expérience individuelle. Ce constat a en effet été récemment décrit dans la littérature. Il a notamment été montré qu'un soin maternel intense au cours de l'allaitement était corrélé, dans la descendance, à une diminution de la méthylation du promoteur du gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe et l'hypothalamus, et à une meilleure gestion du stress à l'âge adulte (Weaver et coll., 2004 ; Champagne et coll., 2006), ou encore, qu'un apprentissage est susceptible d'induire une méthylation rapide et transitoire du promoteur du gène *PP1Cβ* et une déméthylation du gène de la reeline dans l'hippocampe (Miller et Sweatt, 2007).

La méthylation du promoteur du gène *PP1Cβ* par la cocaïne n'a été observée que dans le cas d'un traitement chronique (article 1). Cette méthylation du gène *PP1Cβ* est en accord avec une induction simultanée des DNMT3A et 3B (responsables de la méthylation *de novo*) observée suite à la dernière injection de cocaïne (article 1), suggérant que chaque injection journalière de cocaïne pourrait induire une expression transitoire des DNMT, qui serait déterminante pour la méthylation progressive du gène. Nous avons par ailleurs montré que seul un traitement chronique par la cocaïne induit une augmentation de l'expression de MeCP2 (Cassel et coll., 2006 ; Host et coll., 2011), et que le recrutement accru de MeCP2 au niveau du promoteur de *PP1Cβ* n'est observé qu'après une administration répétée de cocaïne, et non suite à un traitement aigu (article 1). Il semblerait donc que la répression de *PP1Cβ* par la cocaïne soit la conséquence de trois facteurs conjoints : un nombre critique de vagues de méthylation successives nécessaire pour obtenir un degré de méthylation suffisant du promoteur de *PP1Cβ*, une augmentation des taux de MeCP2 et un recrutement accru de cette protéine au niveau du promoteur. Ceci expliquerait pourquoi la répression transcriptionnelle de ce gène n'a été observée que dans le cas d'un traitement chronique par la cocaïne (article 1).

Il est intéressant de noter qu'une méthylation plus importante du gène *PP1Cγ* a été décrite dans le cas d'un traitement chronique vs aigu par la cocaïne (Anier et coll., 2010). Cette observation est en accord avec notre hypothèse selon laquelle des vagues successives de méthylation après chaque injection de cocaïne conduiraient à la méthylation progressive du gène. Dans cette étude, il paraît néanmoins surprenant que l'induction des DNMT3A et 3B n'ait été observée que lors d'un traitement aigu par la cocaïne. En effet, cette restriction ne semble compatible ni avec l'augmentation de la méthylation du gène *PP1Cγ* observée après un traitement chronique par la cocaïne, ni avec l'induction des DNMT que nous et d'autres laboratoires avons mis en évidence suite à une exposition répétée à la cocaïne (article 1 ;

Laplant et coll., 2010). Il convient toutefois de préciser que ces différences d'expression observées pour les DNMT pourraient être attribuées aux points de cinétiques choisis, compte tenu du fait que les taux de DNMT sont très variables en fonction du temps suivant la dernière injection de cocaïne. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'une répression transcriptionnelle du gène *PPIC γ* est déjà observée suite à un traitement aigu, celle-ci étant liée à une hyperméthylation de la région promotrice de ce gène et à un recrutement accru de MeCP2 au niveau de cette même région (Anier et coll., 2010). Ces données suggèrent donc que pour certains gènes, une seule vague de méthylation serait suffisante pour recruter MeCP2 et induire une répression de la transcription. Il semble néanmoins curieux que la répression de *PPIC γ* , ainsi que la liaison de MeCP2 au niveau de son promoteur ne soient pas plus fortes après un traitement chronique, étant donné que ce promoteur est davantage méthylé après un traitement chronique par la cocaïne (Anier et coll., 2010), et que l'augmentation des taux de MeCP2 par la cocaïne n'est observée que dans le cas d'administrations répétées (Cassel et coll., 2006 ; Host et coll., 2011).

Il serait donc intéressant d'étudier la cinétique des DNMT3A et 3B, ainsi que le profil de méthylation des gènes *PPIC β* et *C γ* et la transcription de ces gènes qui en découle, suite à des durées intermédiaires de traitement (1, 3, 6 et 9 jours), afin de vérifier nos hypothèses. Ceci nous permettrait d'évaluer le degré de répression transcriptionnelle au fur et à mesure du traitement, et de déterminer le nombre d'injections quotidiennes de cocaïne nécessaire à la répression transcriptionnelle induite par méthylation du promoteur, pour chacun de ces deux gènes.

B. MeCP2, répresseur de la transcription

MeCP2 est classiquement considéré comme un répresseur de la transcription, en particulier du fait de la présence d'un domaine TRD permettant le recrutement de cofacteurs répresseurs, notamment des HDAC (Nan et coll., 1998). Cependant, deux études utilisant la technique des '*microarrays*' ont suggéré que MeCP2 pourrait également être associé à une activation de la transcription, les résultats de ces travaux ayant révélé qu'une majorité des promoteurs de gènes auxquels MeCP2 est lié seraient actifs ; en d'autres termes, que la majorité des gènes auxquels MeCP2 est lié seraient induits et non réprimés (Yasui et coll., 2007 ; Chahrour et coll., 2008). De ces observations en a découlé le postulat que MeCP2

pourrait être soit répresseur, soit activateur de la transcription, en fonction de la nature des co-régulateurs présents (répresseurs ou activateurs) (Cohen et coll., 2008).

Concernant *PP1C β* , nos données associent clairement MeCP2 à une répression de la transcription. Nous avons en effet observé *in vivo* la liaison de MeCP2 au promoteur de *PP1C β* dans le striatum de rat, et nous avons montré que le recrutement accru de MeCP2 au niveau de cette même région, suite à un traitement chronique par la cocaïne, était associé à une répression de *PP1C β* , aussi bien au niveau de l'ARN que de la protéine, dans le striatum de rats traités pendant 10 jours à la cocaïne (article 1). Le rôle de répresseur de la transcription de MeCP2 est par ailleurs confirmé par le fait qu'on observe une induction de l'expression de *PP1C β* dans le CxPF et le striatum de souris *Mecp2^{308/Y}* par rapport aux souris contrôles (article 1). Les souris *Mecp2^{308/Y}* présentent une mutation de MeCP2 similaire à celle observée chez certaines patientes atteintes du syndrome de Rett, et regroupent les principales caractéristiques du phénotype Rett (Shahbazian et coll., 2002a ; Moretti et coll., 2005 et 2006). Elles présentent en effet un dysfonctionnement moteur et un déficit d'interactions sociales (Shahbazian et coll., 2002a ; Moretti et coll., 2005), ainsi qu'une altération des processus d'apprentissage et de mémoire (Moretti et coll., 2006). Néanmoins, bien que la mutation 308 conduise à une protéine MeCP2 tronquée, celle-ci possède toujours les domaines fonctionnels essentiels de MeCP2 comme les domaines MBD et TRD, et est toujours localisée au niveau de l'hétérochromatine (Shahbazian et coll., 2002a). Il a cependant été récemment démontré que la partie C-terminale de la protéine, partie justement en C-terminal de la mutation 308, contient deux autres domaines de liaison à l'ADN et un domaine de liaison spécifique à la chromatine, fortement impliqués dans la compaction des nucléosomes (Ghosh et coll., 2010). Ces observations permettent non seulement d'expliquer le phénotype observé chez les souris *Mecp2^{308/Y}*, mais sont également en accord avec le fait que l'induction de l'expression de *PP1C β* observée dans les structures cérébrales de ces souris résulte bien d'un déficit de répression de la transcription par MeCP2, la protéine tronquée *MeCP2³⁰⁸* ne contenant plus certains domaines impliqués dans la compaction de la chromatine.

PP1C β peut donc être considéré comme un nouveau gène-cible de MeCP2, qui pourrait, au vu de son rôle dans les processus de plasticité synaptique et structurale, participer au phénotype associé au syndrome de Rett. En effet, bien que les études par 'microarrays' aient montré un grand nombre de gènes dont l'expression est régulée par MeCP2, peu de

cibles directes de MeCP2 ont été identifiées à ce jour dans le cerveau adulte (pour liste : voir Miyake et coll., 2011). Le gène *PP1Cβ* constitue ainsi un nouvel axe de recherche particulièrement intéressant dans l'étude et la compréhension de cette pathologie. La dérégulation de l'expression du gène *PP1Cβ* pourrait notamment sous-tendre les altérations de plasticité synaptique observées chez les souris *Mecp2*^{308/Y} au niveau de l'hippocampe, mais aussi des cortex moteurs et sensoriels, et de ce fait jouer un rôle clé dans les déficits d'apprentissage et de mémoire, les dysfonctionnements moteurs et la perturbation des interactions sociales, caractéristiques du syndrome de Rett.

Bien que *PP1Cβ* soit un gène-cible de MeCP2, il faut souligner que son expression n'est pas exclusivement contrôlée par celle de MeCP2. Dans le cas d'un renforçateur naturel, nous avons en effet montré que les expressions de *PP1Cβ* et de *MeCP2* sont toutes deux induites par un conditionnement opérant (article 2). L'absence de répression de *PP1Cβ* pourrait être liée à une déméthylation du promoteur du gène *PP1Cβ*, empêchant ainsi le recrutement de MeCP2 au niveau de cette région, et donc la répression de la transcription. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser des CHIP avec des anticorps anti-MeCP2 et anti-Tet pour évaluer le degré de recrutement de MeCP2 et de Tet au niveau du promoteur. Ces études pourraient être complétées par des immunoprécipitations d'ADN avec des anticorps dirigés contre les 5-méthylcytosines et les 5-hydroxyméthylcytosines, et ce afin d'étudier le niveau de méthylation de la région promotrice de *PP1Cβ* dans cette même condition. Le recrutement des DNMT pourrait également être évalué par la technique de CHIP avec des anticorps dirigés contre les DNMT3A et 3B. Il est en effet possible que certains facteurs de transcription soient fixés à la région promotrice de *PP1Cβ* et en interdisent l'accès aux DNMT et/ou à MeCP2, ce qui expliquerait également pourquoi dans cette condition, l'expression de *PP1Cβ* est induite malgré l'augmentation des taux de MeCP2.

C. Cocaïne et méthylation de l'ADN

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, des études récentes ont montré que les effets de la cocaïne sont en partie sous-tendus par des modifications de la méthylation de l'ADN dans le cerveau adulte. Ces travaux se sont majoritairement intéressés aux conséquences d'une modulation des taux de MeCP2 (Deng et coll., 2010 ; Im et coll., 2010) ou des DNMT (Anier et coll., 2010 ; Han et coll., 2010 ; LaPlant et coll., 2010) sur les effets

de la cocaïne. Par contre, peu d'études ont cherché à identifier des gènes dont le profil de méthylation était altéré par la cocaïne. Notre équipe a ainsi été la première à montrer qu'un agent pharmacologique comme la cocaïne était capable d'induire la méthylation d'un gène, *cdkl5* (Carouge et coll., 2010), dans le cerveau adulte, ce qui a été confirmé avec l'exemple du gène *PP1C γ* (Anier et coll., 2010). Ce travail de thèse a donc permis d'identifier un nouveau gène, *PP1C β* , dont le profil de méthylation est modifié par la cocaïne et qui pourrait par conséquent être directement impliqué dans les effets de la cocaïne (article 1). Nos données confirment par ailleurs la régulation dynamique de l'expression des DNMT3A et 3B en réponse à la cocaïne (Anier et coll., 2010 ; LaPlant et coll., 2010) et l'étendent à d'autres structures du système de récompense (CPu et CxPF ; article 1).

III. Répression de *PP1C β* et amplification des effets de la cocaïne

La sous-unité catalytique β de PP1 (articles 1 et 2), tout comme $\gamma 1$ (Anier et coll., 2010) est réprimée par la cocaïne. Or PP1, *via* son interaction avec DARPP-32, est impliquée dans la régulation de l'état de phosphorylation de multiples protéines, dont la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA (Fienberg et coll., 1998 ; Snyder et coll., 1998 ; Flores-Hernandez et coll., 2002), la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA (Yan et coll., 1999), la CaMKII (Genoux et coll., 2002) ou encore CREB (Liu et Graybiel, 1996 ; Hyman et Malenka, 2001). Il est important de rappeler que DARPP-32 est exclusivement exprimé dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Ouimet et coll., 1984 ; Dawson et coll., 1990 ; Anderson et Reiner, 1991 ; Le Moine et coll., 1991). Or, Strack et coll. ont localisé la sous-unité $\gamma 1$ dans ces mêmes neurones, mais pas la sous-unité β , celle-ci étant initialement décrite comme exprimée dans les interneurons cholinergiques géants (Strack et coll., 1999). Néanmoins, compte tenu du marquage *PP1C β* que nous avons observé (articles 1 et 2), tant au niveau de la taille des cellules marquées que de leur nombre, il ne semble pas que la sous-unité β soit exclusivement exprimée dans les interneurons cholinergiques géants, ceux-ci représentant moins de 10% des cellules du striatum. Nos résultats sont donc en faveur d'une expression dans les deux types cellulaires. Ils sont fondés sur l'utilisation d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le peptide purifié PRTANPPKKR (acides aminés 318-327),

correspondant à la partie C-terminale de la sous-unité PP1C β , à savoir la même séquence d'acides aminés que celle utilisée par Strack et coll. (1999). La spécificité de cet anticorps a par ailleurs été vérifiée par Western Blot, l'anticorps reconnaissant une protéine du poids moléculaire attendu de 38 k correspondant à celui de PP1C β (article 1). Ainsi, PP1C β serait en partie localisée dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum, et son activité pourrait de ce fait, tout comme celle de PP1C γ 1, être régulée par DARPP-32.

Compte tenu des substrats de PP1, la répression de PP1C β par la cocaïne pourrait favoriser la phosphorylation de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA, de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA et de la CaMKII, potentialisant la voie de la PKA activée par la stimulation du récepteur D1 de la DA, même si cet effet semble plutôt lié à la sous-unité γ 1, celle-ci étant préférentiellement localisée au niveau des épines dendritiques, et donc à proximité de ces substrats. Quoiqu'il en soit, la répression de ces sous-unités catalytiques de PP1 permettrait *in fine* de participer, voire d'amplifier les effets de la cocaïne. Il serait cependant nécessaire de mesurer l'activité phosphatasique afin de vérifier que la diminution d'expression de PP1C β et C γ induite par la cocaïne est effectivement corrélée à une diminution de l'activité enzymatique de PP1 et de confirmer ainsi la potentialisation des effets de la cocaïne.

Il est par ailleurs important de considérer l'expression nucléaire des isoformes PP1C β et C γ 1 (Ouimet et coll., 1995 ; Strack et coll., 1999 ; Lontay et coll., 2004 ; Koshibu et coll., 2009). La fraction nucléaire de PP1 est en effet impliquée d'une part dans la régulation de l'activité de CREB, PP1 déphosphorylant la Ser 133 de CREB (Liu et Graybiel, 1996 ; Hyman et Malenka, 2001), et d'autre part dans la régulation de diverses modifications épigénétiques. Elle participe à la déphosphorylation des histones (Hsu et coll., 2000 ; Nowak et Corces, 2004) et intervient dans la déacétylation et la déméthylation des histones, *via* son association avec HDAC1 (Canettieri et coll., 2003 ; Koshibu et coll., 2009) et avec l'histone déméthylase JMJD2A (Koshibu et coll., 2009). De par son implication dans ces différents processus, la fraction nucléaire de PP1 participe ainsi à la régulation de l'expression de gènes contrôlant les processus de plasticité. Il a en effet été montré que l'inhibition de la fraction nucléaire de PP1 est associée à une augmentation de la LTP, ainsi qu'à une augmentation de l'expression de CREB et d'autres gènes impliqués dans les processus de plasticité et, au

contraire, à une répression de l'expression des gènes régulant négativement ces processus (Koshibu et coll., 2009 et 2011 ; Gräff et coll., 2010).

La répression de $PP1C\beta$ et de $C\gamma 1$ par la cocaïne pourrait donc non seulement favoriser la phosphorylation de CREB, et par conséquent son activation, mais également la phosphorylation et l'acétylation des histones. Les modifications de l'activité de facteurs de transcription et les régulations épigénétiques induites par la répression de $PP1C\beta$ et $C\gamma 1$ par la cocaïne pourraient ainsi contribuer à l'activation de programmes transcriptionnels impliqués dans les processus de plasticité synaptique et structurale. Ces programmes transcriptionnels pourraient jouer un rôle important dans le maintien des changements de l'efficacité synaptique et l'induction de changements morphologiques adaptatifs, et sous-tendraient par conséquent le développement de neuroadaptations liées à la cocaïne. La répression de $PP1C\beta$ et $C\gamma 1$ par la cocaïne pourrait de ce fait contribuer au développement de la dépendance. Cette hypothèse semble renforcée par le fait que le développement de la 'dépendance' à la cocaïne chez le Rat est associé à un déficit permanent de LTD, phénomène de plasticité synaptique dans lequel PP1 joue un rôle majeur, alors que des rats consommant de la cocaïne, mais 'non-dépendants', ne présentent qu'un déficit transitoire de LTD (Kasanetz et coll., 2010).

Il serait donc particulièrement intéressant d'observer l'expression de $PP1C\beta$ et $C\gamma$ dans ces deux sous-populations de rats, et notamment au cours du sevrage (1, 10, 30 et 100 jours par exemple après la dernière exposition à la cocaïne), et ce afin d'évaluer la stabilité de leur répression. Des études par 'microarrays' ont en effet montré que l'expression de certains gènes est différenciellement régulée lors d'un traitement chronique par la cocaïne, mais revient à la normale suite à l'arrêt de l'exposition à la drogue, alors que pour d'autres gènes, le profil d'expression induit par la cocaïne est maintenu, même après une période de sevrage (Freeman et coll., 2010). De tels gènes sont ainsi susceptibles non seulement de sous-tendre les neuroadaptations durables induites par la cocaïne et le développement de la dépendance, mais également d'être impliqués dans les phénomènes de 'craving' et de rechute, survenant après de longues périodes d'abstinence.

IV. PP1, cocaïne et mémoire

Etant impliquée dans la plasticité synaptique et structurale (pour revues : Ceulemans et Bollen, 2004 ; Munton et coll., 2004), PP1 participe également aux processus d'apprentissage et de mémoire, au sein desquels elle joue un rôle de régulateur négatif. L'inhibition génétique de PP1 dans le cortex et l'hippocampe durant l'apprentissage induit en effet une amélioration des performances des animaux dans une tâche de reconnaissance d'objets, corrélée à une augmentation de la phosphorylation de la CaMKII, de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA et de CREB, et par conséquent, à l'expression de gènes contrôlés par CREB (Genoux et coll., 2002). PP1 favorise également l'oubli, puisqu'une inhibition de PP1 post-acquisition est associée à un maintien plus long des souvenirs (Genoux et coll., 2002). Des résultats similaires sont observés lorsque seule la fraction nucléaire de PP1 est inhibée, indiquant que l'état de phosphorylation de CREB et les modifications épigénétiques liées à PP1 contribuent fortement aux processus d'apprentissage et de mémoire, en régulant notamment la transcription de gènes impliqués dans les phénomènes de plasticité et de mémoire (Koshibu et coll., 2009 et 2011 ; Gräff et coll., 2010). Ce rôle de suppresseur d'apprentissage et de mémoire de PP1 a par ailleurs été confirmé en conditions physiologiques, une répression de l'expression de *PP1C β* étant observée suite à un conditionnement de peur au contexte (Miller et Sweatt, 2007). Au vu de l'ensemble de ces données, la répression de *PP1C β* et *C γ 1* par la cocaïne que nous avons observée notamment dans le CxPF (CxCG antérieur) et le CPU (articles 1 et 2) pourrait également participer à une meilleure mémorisation des souvenirs liés à la drogue.

Le CxPF médian, et plus particulièrement le CxCG antérieur, a été décrit comme sous-tendant le rappel de l'information contextuelle ancienne (Frankland et coll., 2001 ; Squire et coll., 2001 ; Frankland et Bontempi, 2005). Des études de conditionnement de peur au contexte suggèrent néanmoins que le CxCG antérieur interviendrait plus probablement dans la mise en place de l'association contexte-stimulus inconditionné plutôt que dans le traitement de l'information contextuelle en soi (Malin et McGaugh, 2006). Dans notre cas, un tel rôle pourrait concerner l'association entre l'administration de drogue et le contexte dans lequel elle a lieu. Cette implication du CxCG antérieur dans les mécanismes associatifs apparaît également à travers l'observation, chez des animaux lésés, d'un déficit d'inhibition de la réponse comportementale à des stimuli jamais renforcés, que ce soit en conditionnement

pavlovien ou en conditionnement opérant (Bussey et coll., 1997 ; Cardinal et coll., 2003 ; Ng et coll., 2007), suggérant de ce fait une implication du CxCg antérieur dans des processus d'inhibition des informations non-pertinentes. Un rôle du CxCg antérieur dans des mécanismes attentionnels a également été proposé. Rudy et coll. (2005) interprètent en effet l'activation du CxCg antérieur lors du rappel d'une information ancienne comme reflétant la mise en jeu de ressources attentionnelles supplémentaires, et ce afin de compenser la difficulté d'accès à un souvenir ancien. Elle pourrait notamment permettre d'inhiber les informations non-pertinentes liées au passage du temps et faciliter ainsi le rappel du souvenir. Que ce soit en favorisant le rappel de l'information contextuelle ancienne, ou en potentialisant les associations contexte-drogue, la répression de *PP1C β* par la cocaïne dans le CxCg antérieur pourrait donc contribuer au rappel des souvenirs liés à la drogue. Il a d'ailleurs été montré que l'injection d'inhibiteurs de DNMT dans le CxPF médian est associée à un déficit de rappel de la préférence de place conditionnée à la cocaïne (Han et coll., 2010). *PP1C β* pourrait donc être l'un des gènes dont la méthylation dans le CxPF médian est nécessaire à l'expression de la préférence de place à la cocaïne. Même si la répression de *PP1C β* dans le CxPF semble participer au rappel des souvenirs liés à la drogue, on ne peut s'affranchir d'évaluer l'expression de *PP1C β* en réponse à la cocaïne dans l'hippocampe, cette structure jouant un rôle crucial dans l'encodage et le rappel des souvenirs épisodiques (Gaffan et Gaffan, 1991 ; McMakin et coll., 1995), mais également dans l'encodage et le rappel d'informations contextuelles (Phillips et Ledoux, 1992 ; Rudy et coll., 2002 ; Matus-Amat et coll., 2004 ; Fanselow, 2009).

Il est par ailleurs bien établi que la consommation répétée de drogue favorise le développement d'habitudes liées à la drogue (Everitt et Robbins, 2005). Ces habitudes sont une forme de mémoire procédurale et sont traitées dans le CPU dorsolatéral. Même si les mécanismes sous-tendant ce type de mémoire sont moins étudiés que ceux sous-tendant la mémoire dépendant de l'hippocampe, ils impliquent des processus de LTP au niveau des synapses cortico-striatales (Pittenger et coll., 2006). Ces phénomènes de LTP striatale dépendent de l'activation des récepteurs D1 de la DA (Calabresi et coll., 2000 ; Kerr et Wickens, 2001), de la voie de signalisation de la PKA (Centonze et coll., 2003) et de la régulation de la transcription assurée par CREB (Pittenger et coll., 2006). En favorisant la voie de signalisation de la PKA, et notamment l'état de phosphorylation de CREB, la répression de *PP1C β* par la cocaïne dans le CPU dorsolatéral pourrait de ce fait contribuer au développement de ces habitudes liées à la drogue, ainsi qu'à leur maintien.

Il semblerait que PP1C β participe également à la régulation du conditionnement instrumental. Nous avons en effet montré que le conditionnement opérant à la nourriture induisait une augmentation de l'expression de *PP1C β* , les taux de PP1C β étant plus élevés chez les animaux déclenchant volontairement la libération de pastilles de nourriture que chez les animaux les recevant passivement (article 2). De manière intéressante, cette induction de *PP1C β* n'est plus observée lorsque la nourriture est remplacée par de la cocaïne. En effet, un niveau équivalent d'expression de *PP1C β* est observé chez les animaux s'auto-administrant la cocaïne et chez ceux qui la reçoivent passivement (article 2). Or, l'une des différences majeures observées en terme de comportement entre les animaux s'auto-administrant soit la cocaïne, soit la nourriture, est que dans le cas de la nourriture, les animaux diminuent, au bout de quelques jours, le nombre de 'nosepokes' dans l'orifice actif (NPa) effectués pendant la période réfractaire, ceux-ci n'étant pas renforcés. Au contraire, dans le cas de la cocaïne, une grande quantité de NPa est toujours réalisée pendant la période réfractaire, et ce même au 10^{ème} jour d'auto-administration. Ce comportement pourrait être lié à l'hyperactivité locomotrice, à l'impulsivité et/ou aux stéréotypies induites par la cocaïne, mais il pourrait également refléter une difficulté des animaux renforcés par la cocaïne à adapter leur comportement. La cocaïne est en effet connue pour induire une diminution de la flexibilité comportementale (Stalnaker et coll., 2007 ; van Holst et Schilt, 2011). La répression de *PP1C β* par la cocaïne pourrait ainsi empêcher la transition d'un apprentissage initial (*un nombre donné de NPa induit l'injection de cocaïne*) vers un apprentissage plus adéquat (*un nombre donné de NPa pendant la période valide est nécessaire pour induire l'injection de cocaïne*). La cocaïne perturberait donc les mécanismes d'apprentissage et de mémoire.

Afin de vérifier cette hypothèse, il conviendrait d'injecter des inhibiteurs de PP1 (phospho-DARPP-32 ou phospho-I1 par exemple) dans le NAc, le CPu ou le CxPF de rats soumis au conditionnement opérant à la nourriture après 3 ou 4 jours de test, c'est-à-dire au moment où ces animaux commencent normalement à diminuer le nombre de NPa effectués pendant la période réfractaire. S'ils n'adaptent pas leur comportement et continuent à réaliser un grand nombre de NPa pendant la période réfractaire, on pourrait alors conclure que l'augmentation de PP1C β normalement observée suite au conditionnement opérant à la nourriture participait en effet à l'adaptation comportementale observée avec un renforçateur naturel. Il semble par ailleurs nécessaire d'étendre nos études concernant l'expression de *PP1C β* à l'hippocampe et l'amygdale, deux structures fortement impliquées dans les tâches de conditionnement opérant, comme l'AA par exemple.

V. Drogues et récompenses naturelles

Bien que les drogues activent le système de récompense tout comme les récompenses naturelles (nourriture, eau, comportement sexuel...), différentes études ont montré l'existence de neuroadaptations plus spécialisées. Par exemple, l'administration volontaire de cocaïne, mais pas celle de saccharose ou de nourriture, induit un phénomène de LTP durable dans la VTA (Chen et coll., 2008). Il a par ailleurs été démontré que les processus de renforcement de la cocaïne étaient altérés par des stimulations électriques répétées des structures du système de récompense, ce qui n'était pas le cas de ceux sous-tendant les renforcements naturels (Levy et coll., 2007). L'existence de neuroadaptations différentielles entre drogues et renforçateurs naturels est également attestée par le fait que des inhibiteurs de HDAC diminuent l'auto-administration de cocaïne, mais n'affectent pas celle de saccharose (Romieu et coll., 2008).

Peu d'études ont cherché à caractériser les gènes différentiellement régulés par les drogues et les récompenses naturelles. Ces gènes seraient pourtant susceptibles d'expliquer les neuroadaptations spécifiques à chacun de ces types de renforçateurs. On sait néanmoins que les facteurs de transcription réputés pour intervenir dans les modifications liées aux drogues, comme Δ FosB ou CREB, présentent des profils d'expression similaires suite à l'administration de drogues ou de renforçateurs naturels. On retrouve une accumulation de Δ FosB dans le NAc, aussi bien en réponse à une exposition répétée à la drogue qu'en réponse aux récompenses naturelles (Wallace et coll., 2008). Ce facteur participerait en fait à la régulation du conditionnement instrumental, quel que soit le type de récompense considéré (Olausson et coll., 2006). De même, l'altération de l'activité de CREB dans le NAc est tout aussi bien corrélée à une diminution de la préférence pour la morphine que pour le saccharose (Barrot et coll., 2002). Il est par ailleurs intéressant de souligner que bien qu'un grand nombre d'études se soient intéressées à l'activité ou à l'expression des facteurs de transcription CREB, Δ FosB ou encore c-Fos en réponse à la cocaïne, il n'existe que peu de données ayant abordé la question de l'expression des gènes qu'ils contrôlent, en réponse à la cocaïne. Pourtant, bon nombre de gènes contiennent des sites CRE ou AP1 dans leur promoteur et sont donc susceptibles d'être régulés par CREB ou Fos/Jun.

Il a néanmoins été montré que certains gènes précoces comme *zif286* (ou *egr-1*), *ania-3*, *MKP-1* ('*MAPK phosphatase 1*'), *c-fos* ou encore *Nr4a3* (ou *NOR1*, '*Neuron-derived Orphan Receptor 1*') présentent des profils d'expression distincts, voire opposés, dans le cas de comportements de recherche d'héroïne ou de saccharose (Schmidt et coll., 2005 ; Koya et coll., 2006). Nous avons montré dans le 2^{ème} article que *MeCP2* et *PP1Cβ* étaient différenciellement régulés par la cocaïne et la nourriture. Il est de ce fait tentant de postuler que *PP1Cβ* et *MeCP2* seraient sous le contrôle d'un ou plusieurs de ces gènes précoces. *PP1Cβ* et *MeCP2* représentent donc des gènes candidats susceptibles de participer aux neuroadaptations différentielles induites par les drogues et les récompenses naturelles. Il reste cependant à définir les mécanismes neurobiologiques responsables de cet effet différentiel.

Nous avons par ailleurs observé que l'exposition répétée à la cocaïne affectait l'expression de *MeCP2* et de *PP1Cβ* uniquement dans la région CPu du striatum, contrairement à la nourriture pour laquelle l'expression de *MeCP2* et de *PP1Cβ* était également modifiée dans le NAcC et le NAcS (article 2). Ces données indiquent une 'dorsalisation' des régions striatales impliquées dans les effets des drogues, suite à une exposition répétée (Porrino et coll., 2004 et 2007 ; Everitt et Robbins, 2005), ce qui évoque le développement d'habitudes liées à la drogue. Ces résultats renforcent l'hypothèse que des circuits distincts sont activés par les drogues et les récompenses naturelles. En effet, dans le NAc par exemple, le circuit activé par la cocaïne est différent de celui impliqué dans le traitement des informations concernant les récompenses naturelles, comme la nourriture ou l'eau (Carelli et coll., 2000). Il est intéressant de noter que cette distinction est toujours présente après 30 jours d'abstinence, mais que plus de neurones sont activés lors des comportements de recherche de la drogue, comparés à ceux enregistrés lors des comportements de recherche de saccharose (Cameron et Carelli, 2012).

Pour mieux cerner les circuits neuronaux impliqués respectivement dans le mode d'action des drogues et des récompenses naturelles, il semble important d'élargir les recherches à l'hypothalamus, et plus particulièrement aux noyaux ventromédian et latéral, qui gèrent les sensations de satiété et de faim et régulent par conséquent, avec le noyau arqué, la prise alimentaire. Notons que l'hypothalamus est interconnecté au système de récompense et participe donc également à la régulation de la prise de drogue. On sait notamment que les neurones hypothalamiques à orexine/hypocrétine sont impliqués dans les comportements de recherche de drogue (Aston-Jones et coll., 2010 ; Cason et coll., 2010). Il a par ailleurs été

récemment montré qu'un traitement répété à la morphine modifiait l'expression de 86 gènes dans l'hypothalamus, dont certains étaient également régulés par la prise alimentaire (Anghel et coll., 2010). Ces données confirment l'importance de s'intéresser au rôle de l'hypothalamus dans la prise de drogue, et il semble de ce fait particulièrement intéressant d'évaluer l'expression de *PP1C β* et *MeCP2* dans cette structure cérébrale, en réponse à la cocaïne ou à la nourriture.

Conclusion générale

Ce travail de thèse nous a permis d'identifier un nouveau gène dont le profil de méthylation est altéré par la cocaïne dans le cerveau adulte. Nous avons en effet montré que la répression du gène *PP1C β* , suite à une exposition répétée à la cocaïne, est liée à un mécanisme dépendant de la méthylation de la région promotrice du gène, associée au recrutement de MeCP2 au niveau de cette même région. Nous avons par conséquent mis en évidence un nouveau gène-cible de MeCP2 et confirmé l'implication de ce dernier dans la répression de la transcription. Du fait du rôle établi de PP1 dans les processus de plasticité et de mémoire, la répression de *PP1C β* par la cocaïne participe vraisemblablement aux neuroadaptations liées à la cocaïne, et favoriserait la mémorisation des souvenirs, du contexte et des habitudes liées à la drogue. Ce rôle de PP1 dans les processus de plasticité fait également de *PP1C β* un gène probablement impliqué dans les caractéristiques du syndrome de Rett. Ce travail de thèse offre ainsi de nouvelles perspectives de recherche dans l'étude et la compréhension de cette pathologie. Il a par ailleurs permis d'identifier deux gènes, *PP1C β* et *MeCP2*, différenciellement régulés par la cocaïne et la nourriture. Ils sont par conséquent susceptibles de participer aux neuroadaptations spécifiques induites par les drogues et les récompenses naturelles. Enfin, nous avons montré que l'implication de *PP1C β* , tout comme celle de MeCP2, dans les processus d'apprentissage et de mémoire est modifiée par la cocaïne. Nos données semblent donc en accord avec l'hypothèse selon laquelle la dépendance serait, en partie, une pathologie de l'apprentissage.

REFERENCES

A -

- Adhvaryu KK, Selker EU (2008). Protein phosphatase PP1 is required for normal DNA methylation in *Neurospora*. *Genes Dev* **22**(24): 3391-3396.
- Akbarian S, Huang HS (2009). Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry* **65**(3): 198-203.
- Allen PB, Ouimet CC, Greengard P (1997). Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9956-9961.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* **23**(2): 185-188.
- Anden NE, Dahlstrom A, Fuxe K, Larsson K (1965). Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life Sci* **4**(13): 1275-1279.
- Anderson KD, Reiner A (1991). Immunohistochemical localization of DARPP-32 in striatal projection neurons and striatal interneurons: implications for the localization of D1-like dopamine receptors on different types of striatal neurons. *Brain Res* **568**(1-2): 235-243.
- Anderson SM, Famous KR, Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Bass CE, *et al* (2008). CaMKII: a biochemical bridge linking accumbens dopamine and glutamate systems in cocaine seeking. *Nat Neurosci* **11**(3): 344-353.
- Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E, Margolis RL (1998). Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **141**(5): 1207-1215.
- Anghel A, Jamieson CA, Ren X, Young J, Porche R, Ozigbo E, *et al* (2010). Gene expression profiling following short-term and long-term morphine exposure in mice uncovers genes involved in food intake. *Neuroscience* **167**(2): 554-566.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* **35**(12): 2450-2461.
- Anthony, J.C., Warner, L.A., & Kessler, R.C. (1994) Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* **2**: 244-268.
- Ardila A, Rosselli M, Strumwasser S (1991). Neuropsychological deficits in chronic cocaine abusers. *Int J Neurosci* **57**(1-2): 73-79.
- Argilli E, Sibley DR, Malenka RC, England PM, Bonci A (2008). Mechanism and time course of cocaine-induced long-term potentiation in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **28**(37): 9092-9100.
- Ariel M, Cedar H, McCarrey J (1994). Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* **7**(1): 59-63.
- Ascher P, Nowak L (1988). Quisqualate- and kainate-activated channels in mouse central neurones in culture. *J Physiol* **399**: 227-245.
- Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, *et al* (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res* **1314**: 74-90.

Augui S, Filion GJ, Huart S, Nora E, Guggiari M, Maresca M, *et al* (2007). Sensing X chromosome pairs before X inactivation via a novel X-pairing region of the Xic. *Science* **318**(5856): 1632-1636.

B -

Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**(7): 1853-1864.

Balleine BW, Dickinson A (1998). Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology* **37**(4-5): 407-419.

Balmer D, Goldstine J, Rao YM, LaSalle JM (2003). Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J Mol Med (Berl)* **81**(1): 61-68.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, *et al* (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**(2): 291-313.

Barnett G, Hawks R, Resnick R (1981). Cocaine pharmacokinetics in humans. *J Ethnopharmacol* **3**(2-3): 353-366.

Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, *et al* (2002). CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11435-11440.

Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, *et al* (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* **3**(12): 1291-1300.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **63**(1): 182-217.

Bechara A, Damasio H, Damasio AR (2000). Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* **10**(3): 295-307.

Bedford MT (2007). Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**(Pt 24): 4243-4246.

Bellone C, Luscher C (2005). mGluRs induce a long-term depression in the ventral tegmental area that involves a switch of the subunit composition of AMPA receptors. *Eur J Neurosci* **21**(5): 1280-1288.

Bennett PC, Moutsoulas P, Lawen A, Perini E, Ng KT (2003). Novel effects on memory observed following unilateral intracranial administration of okadaic acid, cyclosporin A, FK506 and [MeVal4]CyA. *Brain Res* **988**(1-2): 56-68.

Bennett PC, Zhao W, Ng KT (2001). Concentration-dependent effects of protein phosphatase (PP) inhibitors implicate PP1 and PP2A in different stages of memory formation. *Neurobiol Learn Mem* **75**(1): 91-110.

Benuck M, Lajtha A, Reith ME (1987). Pharmacokinetics of systemically administered cocaine and locomotor stimulation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **243**(1): 144-149.

Bergman J, Kamien JB, Spealman RD (1990). Antagonism of cocaine self-administration by selective dopamine D(1) and D(2) antagonists. *Behav Pharmacol* **1**(4): 355-363.

Bergman J, Madras BK, Johnson SE, Spealman RD (1989). Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **251**(1): 150-155.

- Berke JD, Hyman SE (2000). Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**(3): 515-532.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* **42**(1): 33-84.
- Berridge KC (2003). Pleasures of the brain. *Brain Cogn* **52**(1): 106-128.
- Berridge KC, Robinson TE (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* **28**(3): 309-369.
- Bhutani N, Burns DM, Blau HM (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* **146**(6): 866-872.
- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, *et al* (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* **410**(6826): 376-380.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, *et al* (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* **402**(6762): 669-671.
- Bienvenu T, Chelly J (2006). Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* **7**(6): 415-426.
- Bienvenu T, Philippe C, De Roux N, Raynaud M, Bonnefond JP, Pasquier L, *et al* (2006). The incidence of Rett syndrome in France. *Pediatr Neurol* **34**(5): 372-375.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Bird AP (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* **8**(7): 1499-1504.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**(6407): 31-39.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, *et al* (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* **280**(5371): 1940-1942.
- Bolam JP, Somogyi P, Takagi H, Fodor I, Smith AD (1983). Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* **12**(2): 325-344.
- Bolla KI, Cadet JL, London ED (1998). The neuropsychiatry of chronic cocaine abuse. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **10**(3): 280-289.
- Bollen M (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* **26**(7): 426-431.
- Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* **35**(8): 450-458.
- Bollen M, Stalmans W (1992). The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**(3): 227-281.
- Bonci A, Malenka RC (1999). Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **19**(10): 3723-3730.
- Bordelon JR, Smith Y, Nairn AC, Colbran RJ, Greengard P, Muly EC (2005). Differential localization of protein phosphatase-1alpha, beta and gamma1 isoforms in primate prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **15**(12): 1928-1937.
- Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A (2006). Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* **49**(4): 589-601.

- Boudreau AC, Reimers JM, Milovanovic M, Wolf ME (2007). Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurosci* **27**(39): 10621-10635.
- Boudreau AC, Wolf ME (2005). Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased AMPA receptor surface expression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **25**(40): 9144-9151.
- Bourne J, Harris KM (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* **17**(3): 381-386.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* **564**(2): 203-219.
- Boyes J, Bird A (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**(6): 1123-1134.
- Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2002). Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* **87**(4): 2190-2194.
- Brandeis M, Ariel M, Cedar H (1993). Dynamics of DNA methylation during development. *Bioessays* **15**(11): 709-713.
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, *et al* (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**(6496): 435-438.
- Brebner K, Wong TP, Liu L, Liu Y, Campsall P, Gray S, *et al* (2005). Nucleus accumbens long-term depression and the expression of behavioral sensitization. *Science* **310**(5752): 1340-1343.
- Brena RM, Huang TH, Plass C (2006). Toward a human epigenome. *Nat Genet* **38**(12): 1359-1360.
- Britton DR, Curzon P, Mackenzie RG, Keabian JW, Williams JE, Kerkman D (1991). Evidence for involvement of both D1 and D2 receptors in maintaining cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **39**(4): 911-915.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* **68**(5): 815-834.
- Brownell JE, Allis CD (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 176-184.
- Buck KJ, Amara SG (1994). Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12584-12588.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, *et al* (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**(6201): 783-787.
- Bussey TJ, Everitt BJ, Robbins TW (1997). Dissociable effects of cingulate and medial frontal cortex lesions on stimulus-reward learning using a novel Pavlovian autoshaping procedure for the rat: implications for the neurobiology of emotion. *Behav Neurosci* **111**(5): 908-919.

C -

- Caine SB, Negus SS, Mello NK (2000). Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology (Berl)* **148**(1): 41-51.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK, Bergman J (1999). Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists in rats that self-administer cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **291**(1): 353-360.
- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Picconi B, Bernardi G, Chergui K, *et al* (2000). Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J Neurosci* **20**(22): 8443-8451.
- Cameron CM, Carelli RM (2012). Cocaine abstinence alters nucleus accumbens firing dynamics during goal-directed behaviors for cocaine and sucrose. *Eur J Neurosci* **35**(6): 940-951.
- Canettieri G, Morantte I, Guzman E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, *et al* (2003). Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat Struct Biol* **10**(3): 175-181.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Marbini HD, Toner AJ, Bussey TJ, Robbins TW, *et al* (2003). Role of the anterior cingulate cortex in the control over behavior by Pavlovian conditioned stimuli in rats. *Behav Neurosci* **117**(3): 566-587.
- Carelli RM, Ijames SG, Crumling AJ (2000). Evidence that separate neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" (water and food) reward. *J Neurosci* **20**(11): 4255-4266.
- Carlisle HJ, Kennedy MB (2005). Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **28**(4): 182-187.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001). Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 237-260.
- Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010). CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol Dis* **38**(3): 414-424.
- Cason AM, Smith RJ, Tahsili-Fahadan P, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G (2010). Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. *Physiol Behav* **100**(5): 419-428.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, *et al* (2006). Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* **70**(2): 487-492.
- Cassel S, Revel MO, Kelche C, Zwiller J (2004). Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis* **15**(2): 206-211.
- Castner SA, Goldman-Rakic PS (1999). Long-lasting psychotomimetic consequences of repeated low-dose amphetamine exposure in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* **20**(1): 10-28.
- Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, *et al* (2003). Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* **23**(24): 8506-8512.
- Ceulemans H, Bollen M (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* **84**(1): 1-39.
- Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2002). Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* **24**(4): 371-381.
- Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, *et al* (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* **320**(5880): 1224-1229.

- Chakko S (2002). Arrhythmias associated with cocaine abuse. *Card Electrophysiol Rev* **6**(1-2): 168-169.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2006). Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* **147**(6): 2909-2915.
- Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, *et al* (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**(2): 288-297.
- Chen BT, Hopf FW, Bonci (2010). A Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Ann N Y Acad Sci* **1187**: 129-139.
- Chen J (1993) Dopaminergic mechanisms and brain reward. *Seminars in the Neurosciences* **5**: 315-320.
- Cheng X, Blumenthal RM (2008). Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* **16**(3): 341-350.
- Chergui K, Lacey MG (1999). Modulation by dopamine D1-like receptors of synaptic transmission and NMDA receptors in rat nucleus accumbens is attenuated by the protein kinase C inhibitor Ro 32-0432. *Neuropharmacology* **38**(2): 223-231.
- Church WH, Justice JB, Jr., Byrd LD (1987). Extracellular dopamine in rat striatum following uptake inhibition by cocaine, nomifensine and benzotropine. *Eur J Pharmacol* **139**(3): 345-348.
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW (1999). Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* **72**(6): 2397-2403.
- Clarke EGC (1986) Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem materials, 2th Edition. London: The Pharmaceutical Press.
- Codony X, Vela JM, Ramirez MJ (2011). 5-HT(6) receptor and cognition. *Curr Opin Pharmacol* **11**(1): 94-100.
- Cohen S, Zhou Z, Greenberg ME (2008). Medicine. Activating a repressor. *Science* **320**(5880): 1172-1173.
- Colbran RJ (2004). Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* **24**(39): 8404-8409.
- Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G, *et al* (1997). Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry* **2**(2): 161-168.
- Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng LJ, Shaham Y, *et al* (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* **454**(7200): 118-121.
- Cooper DM, Bier-Laning CM, Halford MK, Ahlijanian MK, Zahniser NR (1986). Dopamine, acting through D-2 receptors, inhibits rat striatal adenylate cyclase by a GTP-dependent process. *Mol Pharmacol* **29**(2): 113-119.
- Cornish JL, Duffy P, Kalivas PW (1999). A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* **93**(4): 1359-1367.
- Cornish JL, Kalivas PW (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* **20**(15): RC89.
- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* **274**(5673): 775-780.
- Coutinho AM, Oliveira G, Katz C, Feng J, Yan J, Yang C, *et al* (2007). MECP2 coding sequence and 3'UTR variation in 172 unrelated autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144B**(4): 475-483.

Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poustka A (1999). A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* **8**(7): 1253-1262.

Crouch MF (1997). Regulation of thrombin-induced stress fibre formation in Swiss 3T3 cells by the 70-kDa S6 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **233**(1): 193-199.

Crowther RA, Olesen OF, Jakes R, Goedert M (1992). The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* **309**(2): 199-202.

Crumb WJ, Jr., Clarkson CW (1990). Characterization of cocaine-induced block of cardiac sodium channels. *Biophys J* **57**(3): 589-599.

D -

da Cruz e Silva EF, Fox CA, Ouimet CC, Gustafson E, Watson SJ, Greengard P (1995). Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci* **15**(5 Pt 1): 3375-3389.

Dawson VL, Dawson TM, Wamsley JK (1990). Muscarinic and dopaminergic receptor subtypes on striatal cholinergic interneurons. *Brain Res Bull* **25**(6): 903-912.

Day JJ, Sweatt JD (2010). DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci* **13**(11): 1319-1323.

de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* **27**(2): 164-175.

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**: 737-749.

De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Vanderschuren LJ (1999) Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroine following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology* **143**(3), 254-260.

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* **347**(6288): 72-76.

Deaton AM, Bird A (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* **25**(10): 1010-1022.

DeFrance JF, Sikes RW, Chronister RB (1985). Dopamine action in the nucleus accumbens. *J Neurophysiol* **54**(6): 1568-1577.

Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, Kim IH, Wetsel WC, West AE (2010). MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* **13**(9): 1128-1136.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**(5686): 1014-1017.

Desdouts F, Cheetham JJ, Huang HB, Kwon YG, da Cruz e Silva EF, Deneffe P, *et al* (1995a). Mechanism of inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32: studies with recombinant DARPP-32 and synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **206**(2): 652-658.

Desdouts F, Cohen D, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (1995b). Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**(15): 8772-8778.

Desdoutis F, Siciliano JC, Greengard P, Girault JA (1995c). Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2682-2685.

Desdoutis F, Siciliano JC, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (1998). Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem J* **330** (Pt 1): 211-216.

Di Chiara G (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* **375**(1-3): 13-30.

Di Chiara G, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(14): 5274-5278.

Docherty JR, Green AR (2010). The role of monoamines in the changes in body temperature induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and its derivatives. *Br J Pharmacol* **160**(5): 1029-1044.

Doonan JH, MacKintosh C, Osmani S, Cohen P, Bai G, Lee EY, *et al* (1991). A cDNA encoding rabbit muscle protein phosphatase 1 alpha complements the Aspergillus cell cycle mutation, bimG11. *J Biol Chem* **266**(28): 18889-18894.

Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, *et al* (2002). Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* **22**(7): 2873-2884.

E -

Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* **16**(8): 1876-1887.

Ehlers MD (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**(2): 511-525.

Elias GM, Elias LA, Apostolides PF, Kriegstein AR, Nicoll RA (2008). Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(52): 20953-20958.

Ellis JJ, Valencia TG, Zeng H, Roberts LD, Deaton RA, Grant SR (2003). CaM kinase II δ phosphorylation of 14-3-3 β in vascular smooth muscle cells: activation of class II HDAC repression. *Mol Cell Biochem* **242**(1-2): 153-161.

Everitt BJ, Dickinson A, Robbins TW (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Brain Res Rev* **36**(2-3): 129-138.

Everitt BJ, Robbins TW (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**(11): 1481-1489.

F -

- Fan S, Zhang MQ, Zhang X (2008). Histone methylation marks play important roles in predicting the methylation status of CpG islands. *Biochem Biophys Res Commun* **374**(3): 559-564.
- Fanselow MS (2009). From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn Sci* **14**(1): 7-15.
- Fatemi M, Wade PA (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J Cell Sci* **119**(Pt 15): 3033-3037.
- Feng J, Yan Z, Ferreira A, Tomizawa K, Liauw JA, Zhuo M, *et al* (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9287-9292.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, *et al* (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* **13**(4): 423-430.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, *et al* (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**(7347): 398-402.
- Fienberg AA, Greengard P (2000). The DARPP-32 knockout mouse. *Brain Res Brain Res Rev* **31**(2-3): 313-319.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, *et al* (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* **281**(5378): 838-842.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* **20**(5): 847-854.
- Flemming W. (1878). Zur Kenntniss der Zelle und ihrer Theilungs Erscheinungen. *Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein* **3**: 23-27.
- Fletcher PJ, Grottick AJ, Higgins GA (2002). Differential effects of the 5-HT(2A) receptor antagonist M100907 and the 5-HT(2C) receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* **27**(4): 576-586.
- Flores-Hernandez J, Cepeda C, Hernandez-Echeagaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, *et al* (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol* **88**(6): 3010-3020.
- Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, *et al* (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* **83**(5): 2996-3004.
- Floresco SB, Phillips AG (2001). Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behav Neurosci* **115**(4): 934-939.
- Florin SM, Kuczenski R, Segal DS (1994). Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. *Brain Res* **654**(1): 53-62.
- Foerde K, Shohamy D (2011). The role of the basal ganglia in learning and memory: insight from Parkinson's disease. *Neurobiol Learn Mem* **96**(4): 624-636.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* **63**(3): 844-914.
- Foster JD, Cervinski MA, Gorentla BK, Vaughan RA (2006). Regulation of the dopamine transporter by phosphorylation. *Handb Exp Pharmacol*(175): 197-214.

Fox MA, Andrews AM, Wendland JR, Lesch KP, Holmes A, Murphy DL (2007). A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)* **195**(2): 147-166.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, *et al* (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10604-10609.

Francis YI, Fa M, Ashraf H, Zhang H, Staniszewski A, Latchman DS, *et al* (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **18**(1): 131-139.

Frankland PW, Bontempi B (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 119-130.

Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* **411**(6835): 309-313.

Freeman WM, Lull ME, Patel KM, Brucklacher RM, Morgan D, Roberts DC, *et al* (2010). Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration. *BMC Neurosci* **11**: 29.

Fremeau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearth A, Gingrich JA, Breese GR, *et al* (1991). Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3772-3776.

Freud S. (1884) Über Coca, in « Centralblatt für die Gesamte Therapie », tome II, 1884, p. 289-314.

Friedman JI, Adler DN, Davis KL (1999). The role of norepinephrine in the pathophysiology of cognitive disorders: potential applications to the treatment of cognitive dysfunction in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **46**(9): 1243-1252.

G -

Gaffan D, Gaffan EA (1991). Amnesia in man following transection of the fornix. A review. *Brain* **114** (Pt 6): 2611-2618.

Garcia-Tornadu I, Perez-Millan MI, Recouvreux V, Ramirez MC, Luque G, Risso GS, *et al* (2010). New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the *Drd2* mouse. *Neuroendocrinology* **92**(4): 207-214.

Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**(2): 261-282.

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* **418**(6901): 970-975.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., *et al* (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**(4986): 1429-1432.

Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu XY, Kalivas PW (1999). Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment. *J Neurochem* **72**(1): 157-165.

Ghosh RP, Nikitina T, Horowitz-Scherer RA, Gierasch LM, Uversky VN, Hite K, *et al* (2010). Unique physical properties and interactions of the domains of methylated DNA binding protein 2. *Biochemistry* **49**(20): 4395-4410.

Girault JA, Hemmings HC, Jr., Williams KR, Nairn AC, Greengard P (1989). Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *J Biol Chem* **264**(36): 21748-21759.

- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**(6566): 606-612.
- Goibert A, Lejeune F, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ (1996). Dopamine D3 (auto) receptors inhibit dopamine release in the frontal cortex of freely moving rats in vivo. *J Neurochem* **66**(5): 2209-2212.
- Goeders NE, McNulty MA, Mirkis S, McAllister KH (1989). Chlordiazepoxide alters intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **33**(4): 859-866.
- Goeders NE, Smith JE (1986). Reinforcing properties of cocaine in the medial prefrontal cortex: primary action on presynaptic dopaminergic terminals. *Pharmacol Biochem Behav* **25**(1): 191-199.
- Gold LH, Balster RL (1992). Effects of buspirone and gepirone on i.v. cocaine self-administration in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **108**(3): 289-294.
- Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW (1990). Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* **10**(7): 2125-2138.
- Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Prog Brain Res* **172**: 603-623.
- Gorelova NA, Yang CR (2000). Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* **84**(1): 75-87.
- Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* **91**(2): 603-649.
- Graff J, Koshibu K, Jouvenceau A, Dutar P, Mansuy IM (2010). Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity. *Learn Mem* **17**(7): 355-363.
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, Ouimet CC, Snyder GL, Fisone G, *et al* (1998). The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Brain Res Rev* **26**(2-3): 274-284.
- Greer M, Williams CM (1963). Dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* **13**: 73-76.
- Gregoretti IV, Lee YM, Goodson HV (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**(1): 17-31.
- Griesmaier E, Keller M (2012). Glutamate receptors - prenatal insults, long-term consequences. *Pharmacol Biochem Behav* **100**(4): 835-840.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001). Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* **412**(6843): 141-142.
- Grossman SD, Hsieh-Wilson LC, Allen PB, Nairn AC, Greengard P (2002). The actin-binding domain of spinophilin is necessary and sufficient for targeting to dendritic spines. *Neuromolecular Med* **2**(1): 61-69.
- Grottick AJ, Fletcher PJ, Higgins GA (2000). Studies to investigate the role of 5-HT(2C) receptors on cocaine- and food-maintained behavior. *J Pharmacol Exp Ther* **295**(3): 1183-1191.
- Gruen RJ, Friedhoff AJ, Coale A, Moghaddam B (1992). Tonic inhibition of striatal dopamine transmission: effects of benzodiazepine and GABAA receptor antagonists on extracellular dopamine levels. *Brain Res* **599**(1): 51-56.
- Gvilia I (2010). Underlying brain mechanisms that regulate sleep-wakefulness cycles. *Int Rev Neurobiol* **93**: 1-21.

H -

Haber SN, Fudge JL (1997). The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* **11**(4): 323-342.

Haddah LM, Winchester JF (1990) Clinical management of poisoning and drug overdose, 2th Edition. Philadelphia : WB Saunders Compagny Inc.

Hagberg BA, Skjeldal OH (1994). Rett variants: a suggested model for inclusion criteria. *Pediatr Neurol* **11**(1): 5-11.

Halford JC, Harrold JA (2012). 5-HT(2C) receptor agonists and the control of appetite. *Handb Exp Pharmacol*(209): 349-356.

Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE (2005). Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* **6**(2): 201-213.

Halpain S, Girault JA, Greengard P (1990). Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature* **343**(6256): 369-372.

Han J, Li Y, Wang D, Wei C, Yang X, Sui N (2010). Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prelimbic cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol* **642**(1-3): 93-98.

Haque FN, Gottesman, II, Wong AH (2009). Not really identical: epigenetic differences in monozygotic twins and implications for twin studies in psychiatry. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **151C**(2): 136-141.

Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, *et al* (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* **37**(3): 254-264.

Harmer CJ, Phillips GD (1998). Enhanced appetitive conditioning following repeated pretreatment with d-amphetamine. *Behav Pharmacol* **9**(4): 299-308.

Harmer CJ, Phillips GD (1999). Enhanced conditioned inhibition following repeated pretreatment with d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **142**(2): 120-131.

Harvey J, Lacey MG (1996). Endogenous and exogenous dopamine depress EPSCs in rat nucleus accumbens in vitro via D1 receptors activation. *J Physiol* **492** (Pt 1): 143-154.

Hemmings HC, Jr., Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984a). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**(5977): 503-505.

Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Elliott JI, Greengard P (1990). Synthetic peptide analogs of DARPP-32 (Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein), an inhibitor of protein phosphatase-1. Phosphorylation, dephosphorylation, and inhibitory activity. *J Biol Chem* **265**(33): 20369-20376.

Hemmings HC, Jr., Williams KR, Konigsberg WH, Greengard P (1984b). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. I. Amino acid sequence around the phosphorylated threonine. *J Biol Chem* **259**(23): 14486-14490.

Hendrich B, Bird A (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **18**(11): 6538-6547.

Henze DA, Gonzalez-Burgos GR, Urban NN, Lewis DA, Barrionuevo G (2000). Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* **84**(6): 2799-2809.

- Heysler CJ, Fienberg AA, Greengard P, Gold LH (2000). DARPP-32 knockout mice exhibit impaired reversal learning in a discriminated operant task. *Brain Res* **867**(1-2): 122-130.
- Hiroi N, Fienberg AA, Haile CN, Alburges M, Hanson GR, Greengard P, *et al* (1999). Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci* **11**(3): 1114-1118.
- Hirokawa N (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**(1): 74-81.
- Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**(4173): 226-232.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**(5007): 851-853.
- Host L, Dietrich JB, Carouge D, Aunis D, Zwiller J (2011). Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition. *J Psychopharmacol* **25**(2): 222-229.
- Howell LL, Byrd LD (1991). Characterization of the effects of cocaine and GBR 12909, a dopamine uptake inhibitor, on behavior in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther* **258**(1): 178-185.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, *et al* (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* **46**(2): 157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 533-554.
- Hsieh-Wilson LC, Allen PB, Watanabe T, Nairn AC, Greengard P (1999). Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* **38**(14): 4365-4373.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, *et al* (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**(3): 279-291.
- Huang CC, Liang YC, Hsu KS (2001). Characterization of the mechanism underlying the reversal of long term potentiation by low frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses. *J Biol Chem* **276**(51): 48108-48117.
- Huang YH, Lin Y, Mu P, Lee BR, Brown TE, Wayman G, *et al* (2009). In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron* **63**(1): 40-47.
- Hubbard MJ, Cohen P (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **18**(5): 172-177.
- Hull EM (2011). Sex, drugs and gluttony: how the brain controls motivated behaviors. *Physiol Behav* **104**(1): 173-177.
- Hyman SE (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* **162**(8): 1414-1422.
- Hyman SE, Malenka RC (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* **2**(10): 695-703.

I -

- Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, *et al* (2001). Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* **62**(4): 401-405.
- Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J, *et al* (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* **6**(1): e22.
- Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, *et al* (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* **6**(9).
- Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010). MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* **13**(9): 1120-1127.
- Ingebritsen TS, Cohen P (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* **132**(2): 255-261.
- Ishibashi T, Thambirajah AA, Ausio J (2008). MeCP2 preferentially binds to methylated linker DNA in the absence of the terminal tail of histone H3 and independently of histone acetylation. *FEBS Lett* **582**(7): 1157-1162.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**(7310): 1129-1133.

J -

- Jackson ME, Frost AS, Moghaddam B (2001). Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* **78**(4): 920-923.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**(1): 165-229.
- Jain RK, Jain MK, Bachenheimer LC, Visner MS, Hamosh P, Tracy CM, *et al* (1990). Factors determining whether cocaine will potentiate the cardiac effects of neurally released norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* **252**(1): 147-153.
- Jasmin L, Narasaiah M, Tien D (2006). Noradrenaline is necessary for the hedonic properties of addictive drugs. *Vascul Pharmacol* **45**(4): 243-250.
- Javaid JI, Fischman MW, Schuster CR, Dekirmenjian H, Davis JM (1978). Cocaine plasma concentration: relation to physiological and subjective effects in humans. *Science* **202**(4364): 227-228.
- Jentsch JD, Taylor JR (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* **146**(4): 373-390.
- Johanson CE, Fischman MW (1989). The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* **41**(1): 3-52.
- Jones DL, Mogenson GJ (1980). Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection subserving ambulatory activity. *Am J Physiol* **238**(1): R65-69.
- Jones PA (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* **13**(7): 484-492.

Jouvert P, Pain L, Aunis D, Zwiller J (2002). The anesthetics propofol and ketamine inhibit cocaine-induced egr-1 gene expression in rat forebrain. *Eur J Pharmacol* **449**(3): 239-243.

Jung BJ, Dawson R, Jr., Sealey SA, Peris J (1999). Endogenous GABA release is reduced in the striatum of cocaine-sensitized rats. *Synapse* **34**(2): 103-110.

K -

Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, *et al* (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* **6**(5): 705-714.

Kalivas PW (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* **10**(8): 561-572.

Kalivas PW, Duffy P (1995). D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **15**(7 Pt 2): 5379-5388.

Kalivas PW, Duffy P, DuMars LA, Skinner C (1988). Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **245**(2): 485-492.

Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993). The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* **4**(4): 315-334.

Kanazawa I, Emson PC, Cuello AC (1977). Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res* **119**(2): 447-453.

Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, *et al* (2008). Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**(7183): 112-115.

Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C, Scurlock J, Mansour A, Makris CM, *et al* (2006). Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. *Neurology* **67**(1): 164-166.

Kasanez F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O, *et al* (2010). Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* **328**(5986): 1709-1712.

Kauer JA, Malenka RC (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* **8**(11): 844-858.

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010). gamma-Aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiatry* **67**(1): 88-92.

Kebabian JW, Beaulieu M, Itoh Y (1984). Pharmacological and biochemical evidence for the existence of two categories of dopamine receptor. *Can J Neurol Sci* **11**(1 Suppl): 114-117.

Kerr B, Alvarez-Saavedra M, Saez MA, Saona A, Young JI (2008). Defective body-weight regulation, motor control and abnormal social interactions in *Mecp2* hypomorphic mice. *Hum Mol Genet* **17**(12): 1707-1717.

Kerr JN, Wickens JR (2001). Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J Neurophysiol* **85**(1): 117-124.

Khroyan TV, Barrett-Larimore RL, Rowlett JK, Spealman RD (2000). Dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in relapse to cocaine-seeking behavior: effects of selective antagonists and agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **294**(2): 680-687.

Killam EK, Killam KF, Shaw T (1957) The effects of psychoterapeutic compounds on central afferent and limbic pathways. *Ann NY Acad Sci* **66** : 784-805.

- Kim WY, Kim S, Kim JH (2008). Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett* **432**(1): 54-57.
- Kim Y, Teylan MA, Baron M, Sands A, Nairn AC, Greengard P (2009). Methylphenidate-induced dendritic spine formation and DeltaFosB expression in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2915-2920.
- King MM, Huang CY, Chock PB, Nairn AC, Hemmings HC, Jr., Chan KF, *et al* (1984). Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J Biol Chem* **259**(13): 8080-8083.
- King MV, Marsden CA, Fone KC (2008). A role for the 5-HT(1A), 5-HT4 and 5-HT6 receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci* **29**(9): 482-492.
- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992). Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7782-7785.
- Klein ME, Lioy DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci* **10**(12): 1513-1514.
- Kleven MS, Woolverton WL (1990). Effects of bromocriptine and desipramine on behavior maintained by cocaine or food presentation in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **101**(2): 208-213.
- Klose RJ, Bird AP (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
- Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP (2005). DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell* **19**(5): 667-678.
- Klose RJ, Zhang Y (2007). Regulation of histone methylation by demethyliminination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 307-318.
- Knuepfer MM (2003). Cardiovascular disorders associated with cocaine use: myths and truths. *Pharmacol Ther* **97**(3): 181-222.
- Koob GF, Bloom FE (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**(4879): 715-723.
- Koob GF, Le Moal M (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**(5335): 52-58.
- Koob GF, Le Moal M (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**(2): 97-129.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004). CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* **42**(6): 961-972.
- Koshibu K, Graff J, Beullens M, Heitz FD, Berchtold D, Russig H, *et al* (2009). Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *J Neurosci* **29**(41): 13079-13089.
- Koshibu K, Graff J, Mansuy IM (2011). Nuclear protein phosphatase-1: an epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation. *Neuroscience* **173**: 30-36.
- Kottler ML (2006). [Epigenetic mechanisms in metabolic disorders]. *Ann Biol Clin (Paris)* **64**(6): 588-590.
- Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR, Thomas MJ (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **27**(30): 7921-7928.
- Kouzarides T (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 198-209.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4): 693-705.

Koya E, Spijker S, Voorn P, Binnekade R, Schmidt ED, Schoffelmeer AN, *et al* (2006). Enhanced cortical and accumbal molecular reactivity associated with conditioned heroin, but not sucrose-seeking behaviour. *J Neurochem* **98**(3): 905-915.

Kreiss DS, Bergstrom DA, Gonzalez AM, Huang KX, Sibley DR, Walters JR (1995). Dopamine receptor agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D3 receptor binding affinities. *Eur J Pharmacol* **277**(2-3): 209-214.

Kriaucionis S, Bird A (2004). The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1818-1823.

Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, *et al* (2005). Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* **48**(2): 303-314.

Kumar A, Kamboj S, Malone BM, Kudo S, Twiss JL, Czymmek KJ, *et al* (2008). Analysis of protein domains and Rett syndrome mutations indicate that multiple regions influence chromatin-binding dynamics of the chromatin-associated protein MECP2 in vivo. *J Cell Sci* **121**(Pt 7): 1128-1137.

Kwon YG, Huang HB, Desdouits F, Girault JA, Greengard P, Nairn AC (1997). Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3536-3541.

L -

Lalande M (1996). Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet* **30**: 173-195.

Landry Y, Gies JP (2003) Pharmacologie. Des cibles vers l'indication thérapeutique. © Dunod, Paris.

LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, 3rd, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, *et al* (2010). Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* **13**(9): 1137-1143.

Laroche S, Davis S, Jay TM (2000). Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* **10**(4): 438-446.

Lau A, Tymianski M (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* **460**(2): 525-542.

Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4205-4209.

Le Pen G, Duterte-Boucher D, Costentin J (1996) Place conditioning with cocaine and the dopamine uptake inhibitor GBR12783. *Neuroreport*. **7**(18) : 2839-42.

Lebeau B (2006). Cocaïne : de la mythologie à la consommation de masse. Revue Toxibase.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **405**(6789): 955-959.

Lee HK, Kirkwood A (2011). AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Semin Cell Dev Biol* **22**(5): 514-520.

Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, *et al* (2007). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**(6): 1084-1096.

- Lee KW, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Greengard P (2006). Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3399-3404.
- Lesage B, Beullens M, Ceulemans H, Himpens B, Bollen M (2005). Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* **579**(25): 5626-5630.
- 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): 40545-40559.
- Levenson JM, Sweatt JD (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* **6**(2): 108-118.
- Levitzki A (1986). Beta-adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol Rev* **66**(3): 819-854.
- Levy D, Shabat-Simon M, Shalev U, Barnea-Ygael N, Cooper A, Zangen A (2007). Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not "natural" reinforcement. *J Neurosci* **27**(51): 14179-14189.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, *et al* (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**(6): 905-914.
- Li B, Carey M, Workman JL (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**(4): 707-719.
- Li E (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**(9): 662-673.
- Li J, Olinger AB, Dassow MS, Abel MS (2003). Up-regulation of GABA(B) receptor mRNA and protein in the hippocampus of cocaine- and lidocaine-kindled rats. *Neuroscience* **118**(2): 451-462.
- Li JX, Han R, Deng YP, Chen SQ, Liang JH (2005). Different effects of valproate on methamphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Behav Brain Res* **161**(1): 125-132.
- Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG (1998). Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem* **273**(34): 21901-21908.
- Lichtenfeld PJ, Rubin DB, Feldman RS (1984). Subarachnoid hemorrhage precipitated by cocaine snorting. *Arch Neurol* **41**(2): 223-224.
- Lin CW, Miller TR, Witte DG, Bianchi BR, Stashko M, Manelli AM, *et al* (1995). Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells. *Mol Pharmacol* **47**(1): 131-139.
- Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, *et al* (2000). Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci* **3**(12): 1282-1290.
- Lin Q, Buckler ESt, Muse SV, Walker JC (1999). Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol Phylogenet Evol* **12**(1): 57-66.
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm BB, Greengard P, Fisone G (1999). Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience* **88**(4): 1005-1008.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 175-190.
- Liu FC, Graybiel AM (1996). Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* **17**(6): 1133-1144.
- Liu J, Francke U (2006). Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression. *Hum Mol Genet* **15**(11): 1769-1782.

- Liu Y, Edwards RH (1997). The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* **20**: 125-156.
- Lontay B, Serfozo Z, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F (2004). Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol* **478**(1): 72-87.
- Lopez-Serra L, Esteller M (2008). Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* **98**(12): 1881-1885.
- Loury R, Sassone-Corsi P (2003). Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods* **31**(1): 40-48.
- Lu L, Grimm JW, Shaham Y, Hope BT (2003). Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem* **85**(6): 1604-1613.
- Luo L (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* **1**(3): 173-180.
- Luscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, *et al* (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* **24**(3): 649-658.
- Lydiard RB (2003). The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* **64 Suppl 3**: 21-27.

M -

- Ma F, Falk JL, Lau CE (1999). Cocaine pharmacodynamics after intravenous and oral administration in rats: relation to pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)* **144**(4): 323-332.
- Maccioni RB, Cambiasso V (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**(4): 835-864.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**(6069): 519-522.
- MacDonald AW, 3rd, Chafee MV (2006). Translational and developmental perspective on N-methyl-D-aspartate synaptic deficits in schizophrenia. *Dev Psychopathol* **18**(3): 853-876.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994). GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**: 569-602.
- Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* **8**(19): 2282-2292.
- MacMillan LB, Bass MA, Cheng N, Howard EF, Tamura M, Strack S, *et al* (1999). Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem* **274**(50): 35845-35854.
- Maisonneuve IM, Keller RW, Glick SD (1990). Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res* **535**(2): 221-226.
- Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacology* **35**(8): 1625-1652.
- Malchiodi-Albedi F, Petrucci TC, Picconi B, Iosi F, Falchi M (1997). Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **48**(5): 425-438.

- Malenka RC, Nicoll RA (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**(5435): 1870-1874.
- Malin EL, McGaugh JL (2006). Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1959-1963.
- Mandelkow E, Mandelkow EM (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 72-81.
- Marchi M, Guarda A, Bergo A, Landsberger N, Kilstrup-Nielsen C, Ratto GM, *et al* (2007). Spatio-temporal dynamics and localization of MeCP2 and pathological mutants in living cells. *Epigenetics* **2**(3): 187-197.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**(4): 619-628.
- Martin C, Zhang Y (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-849.
- Martin-Iverson MT, Szostak C, Fibiger HC (1986). 6-Hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex fail to influence intravenous self-administration of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* **88**(3): 310-314.
- Marushige K (1976). Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(11): 3937-3941.
- Masserano JM, Baker I, Natsukari N, Wyatt RJ (1996). Chronic cocaine administration increases tyrosine hydroxylase activity in the ventral tegmental area through glutaminergic- and dopaminergic D2-receptor mechanisms. *Neurosci Lett* **217**(2-3): 73-76.
- Matus-Amat P, Higgins EA, Barrientos RM, Rudy JW (2004). The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* **24**(10): 2431-2439.
- Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, *et al* (2010). Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* **327**(5962): 213-216.
- Maze I, Nestler EJ (2011). The epigenetic landscape of addiction. *Ann N Y Acad Sci* **1216**: 99-113.
- McGhee JD, Felsenfeld G (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* **49**: 1115-1156.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, *et al* (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* **12**(3): 342-348.
- McMackin D, Cockburn J, Anslow P, Gaffan D (1995). Correlation of fornix damage with memory impairment in six cases of colloid cyst removal. *Acta Neurochir (Wien)* **135**(1-2): 12-18.
- McQuown SC, Wood MA (2010). Epigenetic regulation in substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep* **12**(2): 145-153.
- Meador-Woodruff JH, Healy DJ (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* **31**(2-3): 288-294.
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, *et al* (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**(7183): 45-50.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, *et al* (2002). Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* **5**(3): 267-271.
- Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, *et al* (2010). Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* **13**(6): 664-666.

- Miller CA, Sweatt JD (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* **53**(6): 857-869.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995). A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **46**(4): 423-462.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**(1): 189-225.
- Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, *et al* (2011). The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci* **12**: 81.
- Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, *et al* (2004). A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* **36**(4): 339-341.
- Mogenson GJ, Yang CR, Yim CY (1988). Influence of dopamine on limbic inputs to the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* **537**: 86-100.
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, *et al* (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* **30**(6): 755-766.
- Monti JM (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev* **15**(4): 269-281.
- Moore RY, Bloom FE (1979). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* **2**: 113-168.
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemee A (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 234-244.
- Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY (2005). Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* **14**(2): 205-220.
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, *et al* (2006). Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* **26**(1): 319-327.
- Morishita W, Connor JH, Xia H, Quinlan EM, Shenolikar S, Malenka RC (2001). Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* **32**(6): 1133-1148.
- Mulder AB, Hodenpijl MG, Lopes da Silva FH (1998). Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci* **18**(13): 5095-5102.
- Muly EC, Greengard P, Goldman-Rakic PS (2001). Distribution of protein phosphatases-1 alpha and -1 gamma 1 and the D(1) dopamine receptor in primate prefrontal cortex: Evidence for discrete populations of spines. *J Comp Neurol* **440**(3): 261-270.
- Munton RP, Vizi S, Mansuy IM (2004). The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett* **567**(1): 121-128.

N -

- Nadel L, Moscovitch M (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* **7**(2): 217-227.
- Nagarajan RP, Hogart AR, Gweye Y, Martin MR, LaSalle JM (2006). Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics* **1**(4): e1-11.
- Nairn AC, Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Greengard P (2004). The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 14-23.
- Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* **9**(10): 1019-1026.
- Nakanishi H, Obaishi H, Satoh A, Wada M, Mandai K, Satoh K, *et al* (1997). Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol* **139**(4): 951-961.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**(4): 471-481.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, *et al* (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**(6683): 386-389.
- Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB (1978). Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* **3**(4-5): 385-401.
- Nestler EJ (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**(2): 119-128.
- Nestler EJ, Alreja M, Aghajanian GK (1999). Molecular control of locus coeruleus neurotransmission. *Biol Psychiatry* **46**(9): 1131-1139.
- Neul JL, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg EB, Smith EO, *et al* (2008). Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* **70**(16): 1313-1321.
- Newton TF, De La Garza R, 2nd, Kalechstein AD, Nestor L (2005). Cocaine and methamphetamine produce different patterns of subjective and cardiovascular effects. *Pharmacol Biochem Behav* **82**(1): 90-97.
- Ng CW, Noblejas MI, Rodefer JS, Smith CB, Poremba A (2007). Double dissociation of attentional resources: prefrontal versus cingulate cortices. *J Neurosci* **27**(45): 12123-12131.
- Nicoll RA, Malenka RC (1999). Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 515-525.
- Niemann A (1860) Über eine neue organische Base in der Cocablattern. *Archiv der Pharmazie* **153** : 129-155.
- Nieoullon A (2002). Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* **67**(1): 53-83.
- Nikitina T, Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Hansen JC, Grigoryev SA, Woodcock CL (2007b). MeCP2-chromatin interactions include the formation of chromatosome-like structures and are altered in mutations causing Rett syndrome. *J Biol Chem* **282**(38): 28237-28245.
- Nikitina T, Shi X, Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Hansen JC, Woodcock CL (2007a). Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin. *Mol Cell Biol* **27**(3): 864-877.
- Nishi A, Bibb JA, Matsuyama S, Hamada M, Higashi H, Nairn AC, *et al* (2002). Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. *J Neurochem* **81**(4): 832-841.

Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC, Greengard P (2000). Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12840-12845.

Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* **17**(21): 8147-8155.

Norrholm SD, Bibb JA, Nestler EJ, Ouimet CC, Taylor JR, Greengard P (2003). Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience* **116**(1): 19-22.

Noudoost B, Moore T (2011). The role of neuromodulators in selective attention. *Trends Cogn Sci* **15**(12): 585-591.

Nowak SJ, Corces VG (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**(4): 214-220.

O -

O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrman R (1992). A learning model of addiction. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **70**: 157-177.

Oertel WH, Mugnaini E (1984). Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* **47**(3): 233-238.

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E (2004). Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303**(5658): 644-649.

Olausson P, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, Nestler EJ, Taylor JR (2006). DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *J Neurosci* **26**(36): 9196-9204.

Olds J, Milner P (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* **47**(6): 419-427.

Oliver CJ, Terry-Lorenzo RT, Elliott E, Bloomer WA, Li S, Brautigan DL, *et al* (2002). Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4690-4701.

Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, *et al* (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**(7154): 714-717.

Otani S, Auclair N, Desce JM, Roisin MP, Crepel F (1999). Dopamine receptors and groups I and II mGluRs cooperate for long-term depression induction in rat prefrontal cortex through converging postsynaptic activation of MAP kinases. *J Neurosci* **19**(22): 9788-9802.

Otani S, Blond O, Desce JM, Crepel F (1998). Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience* **85**(3): 669-676.

Ouimet CC, da Cruz e Silva EF, Greengard P (1995). The alpha and gamma 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3396-3400.

Ouimet CC, Greengard P (1990). Distribution of DARPP-32 in the basal ganglia: an electron microscopic study. *J Neurocytol* **19**(1): 39-52.

Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC, Jr., Walaas SI, Greengard P (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci* **4**(1): 111-124.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.

P -

Parsons LH, Smith AD, Justice JB, Jr. (1991). Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* **9**(1): 60-65.

Parsons LH, Weiss F, Koob GF (1998). Serotonin1B receptor stimulation enhances cocaine reinforcement. *J Neurosci* **18**(23): 10078-10089.

Pascual-Leone A, Dhuna A, Anderson DC (1991). Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* **41**(1): 34-38.

Paulson PE, Camp DM, Robinson TE (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **103**(4): 480-492.

Payer B, Lee JT (2008). X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet* **42**: 733-772.

Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, *et al* (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**(5979): 753-756.

Peltier R, Schenk S (1993). Effects of serotonergic manipulations on cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **110**(4): 390-394.

Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B (2011). Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Mol Biol Rep* **38**(1): 453-460.

Pennartz CM, Ameerun RF, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH (1993). Synaptic plasticity in an in vitro slice preparation of the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* **5**(2): 107-117.

Pennings S, Allan J, Davey CS (2005). DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**(4): 351-361.

Peters AH, Schubeler D (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 230-238.

Phillips RG, LeDoux JE (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**(2): 274-285.

Pierce RC, Kalivas PW (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* **25**(2): 192-216.

Pifl C, Giros B, Caron MG (1993). Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurosci* **13**(10): 4246-4253.

Pittenger C, Fasano S, Mazzocchi-Jones D, Dunnett SB, Kandel ER, Brambilla R (2006). Impaired bidirectional synaptic plasticity and procedural memory formation in striatum-specific cAMP response element-binding protein-deficient mice. *J Neurosci* **26**(10): 2808-2813.

- Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD (2001). Modulation of cocaine and food self-administration by low- and high-efficacy D1 agonists in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **157**(2): 208-216.
- Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD (2002). Behavioral effects of cocaine and dopaminergic strategies for preclinical medication development. *Psychopharmacology (Berl)* **163**(3-4): 265-282.
- Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13603-13610.
- Porrino LJ, Lyons D, Smith HR, Daunais JB, Nader MA (2004). Cocaine self-administration produces a progressive involvement of limbic, association, and sensorimotor striatal domains. *J Neurosci* **24**(14): 3554-3562.
- Porrino LJ, Smith HR, Nader MA, Beveridge TJ (2007). The effects of cocaine: a shifting target over the course of addiction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**(8): 1593-1600.
- Post RM, Weiss SR, Pert A (1987). The role of context and conditioning in behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacol Bull* **23**(3): 425-429.
- Pyner S (2009). Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat* **38**(3): 197-208.

R -

- Ramakers GJ (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* **25**(4): 191-199.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, *et al* (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* **92**(2-3): 179-212.
- Reichwald K, Thiesen J, Wiehe T, Weitzel J, Poustka WA, Rosenthal A, *et al* (2000). Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome* **11**(3): 182-190.
- Renthal W, Kumar A, Xiao G, Wilkinson M, Covington HE, 3rd, Maze I, *et al* (2009). Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* **62**(3): 335-348.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, 3rd, Xiao G, Kumar A, *et al* (2007). Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* **56**(3): 517-529.
- Renthal W, Nestler EJ (2008). Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med* **14**(8): 341-350.
- Resnick RB, Kestenbaum RS, Schwartz LK (1977). Acute systemic effects of cocaine in man: a controlled study by intranasal and intravenous routes. *Science* **195**(4279): 696-698.
- Ressler KJ, Nemeroff CB (1999). Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry* **46**(9): 1219-1233.
- Richardson NR, Roberts DC (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* **66**(1): 1-11.
- Richardson NR, Smith AM, Roberts DC (1994). A single injection of either flupenthixol decanoate or haloperidol decanoate produces long-term changes in cocaine self-administration in rats. *Drug Alcohol Depend* **36**(1): 23-25.

- Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**(1): 9-25.
- Robbe D, Bockaert J, Manzoni OJ (2002). Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdrawn mice. *Eur J Neurosci* **16**(11): 2231-2235.
- Robbins TW, Everitt BJ (1999). Drug addiction: bad habits add up. *Nature* **398**(6728): 567-570.
- Roberts DC (1993). Self-administration of GBR 12909 on a fixed ratio and progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **111**(2): 202-206.
- Roberts DC, Andrews MM (1997). Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology (Berl)* **131**(3): 271-277.
- Roberts DC, Koob GF (1982). Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **17**(5): 901-904.
- Roberts DC, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* **12**(5): 781-787.
- Robertson KD, Wolffe AP (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**(1): 11-19.
- Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-291.
- Robinson TE, Berridge KC (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* **95 Suppl 2**: S91-117.
- Robinson TE, Berridge KC (2003). Addiction. *Annu Rev Psychol* **54**: 25-53.
- Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001). Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* **39**(3): 257-266.
- Robinson TE, Kolb B (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* **17**(21): 8491-8497.
- Robinson TE, Kolb B (1999). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* **11**(5): 1598-1604.
- Robinson TE, Kolb B (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 33-46.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* **12**(11): 623-637.
- Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, *et al* (1998). Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* **1**(2): 132-137.
- Rogers RD, Everitt BJ, Baldacchino A, Blackshaw AJ, Swainson R, Wynne K, *et al* (1999). Dissociable deficits in the decision-making cognition of chronic amphetamine abusers, opiate abusers, patients with focal damage to prefrontal cortex, and tryptophan-depleted normal volunteers: evidence for monoaminergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **20**(4): 322-339.
- Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008). Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci* **28**(38): 9342-9348.
- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci* **67**(12): 1971-1986.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.

- Rothman RB, Glowa JR (1995). A review of the effects of dopaminergic agents on humans, animals, and drug-seeking behavior, and its implications for medication development. Focus on GBR 12909. *Mol Neurobiol* **11**(1-3): 1-19.
- Rothwell JC (2011). The motor functions of the basal ganglia. *J Integr Neurosci* **10**(3): 303-315.
- Rousseaux S, Faure AK, Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, *et al* (2004). [Organizing the sperm nucleus]. *Gynecol Obstet Fertil* **32**(9): 785-791.
- Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC (2002). Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci* **116**(4): 530-538.
- Rudy JW, Biedenkapp JC, O'Reilly RC (2005). Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learn Mem* **12**(5): 445-446.
- Ruffolo RR, Jr., Hieble JP (1994). Alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Ther* **61**(1-2): 1-64.
- Ruhe HG, Mason NS, Schene AH (2007). Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* **12**(4): 331-359.
- Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* **190**(4210): 117-128.
- Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, *et al* (2008). CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem* **283**(44): 30101-30111.
- Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ (2010). The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* **33**(6): 267-276.
- Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, *et al* (2009). Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J Neurosci* **29**(11): 3529-3537.

S -

- Sado T, Wang Z, Sasaki H, Li E (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Development* **128**(8): 1275-1286.
- Sahu A, Tyeryar KR, Vongtau HO, Sibley DR, Undieh AS (2009). D5 dopamine receptors are required for dopaminergic activation of phospholipase C. *Mol Pharmacol* **75**(3): 447-453.
- Sangrador A, Andres I, Eguiraun A, Lorenzo ML, Ortiz JM (1998). Growth arrest of *Schizosaccharomyces pombe* following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol Gen Genet* **259**(5): 449-456.
- Sar M, Stumpf WE, Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* **182**(1): 17-37.
- Sarrouilhe D, di Tommaso A, Metaye T, Ladeveze V (2006). Spinophilin: from partners to functions. *Biochimie* **88**(9): 1099-1113.
- Sarti F, Borgland SL, Kharazia VN, Bonci A (2007). Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **26**(3): 749-756.
- Schenk S, Valadez A, Worley CM, McNamara C (1993). Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). *Behav Pharmacol* **4**(6): 652-659.

- Schiffmann SN, Lledo PM, Vincent JD (1995). Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. *J Physiol* **483** (Pt 1): 95-107.
- Schmidt ED, Voorn P, Binnekade R, Schoffeleer AN, De Vries TJ (2005). Differential involvement of the prelimbic cortex and striatum in conditioned heroin and sucrose seeking following long-term extinction. *Eur J Neurosci* **22**(9): 2347-2356.
- Schoenfeld TA, Obar RA (1994). Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* **151**: 67-137.
- Schotanus SM, Chergui K (2008). Dopamine D1 receptors and group I metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term potentiation in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* **54**(5): 837-844.
- Schramm-Sapota NL, Olsen CM, Winder DG (2006). Cocaine self-administration reduces excitatory responses in the mouse nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology* **31**(7): 1444-1451.
- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, *et al* (2001). Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* **433**(4): 526-549.
- Seamans JK, Yang CR (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* **74**(1): 1-58.
- Self DW, Barnhart WJ, Lehman DA, Nestler EJ (1996). Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science* **271**(5255): 1586-1589.
- Self DW, Karanian DA, Spencer JJ (2000). Effects of the novel D1 dopamine receptor agonist ABT-431 on cocaine self-administration and reinstatement. *Ann N Y Acad Sci* **909**: 133-144.
- Selvi BR, Cassel JC, Kundu TK, Boutillier AL (2010). Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1799**(10-12): 840-853.
- Sequeira-Mendes J, Diaz-Uriarte R, Apedaile A, Huntley D, Brockdorff N, Gomez M (2009). Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genet* **5**(4): e1000446.
- Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, *et al* (2002a). Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* **35**(2): 243-254.
- Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY (2002b). Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* **11**(2): 115-124.
- Shalev U, Morales M, Hope B, Yap J, Shaham Y (2001). Time-dependent changes in extinction behavior and stress-induced reinstatement of drug seeking following withdrawal from heroin in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **156**(1): 98-107.
- Shen HW, Toda S, Moussawi K, Bouknight A, Zahm DS, Kalivas PW (2009). Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J Neurosci* **29**(9): 2876-2884.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* **368**(6467): 144-147.
- Shi Y (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**(3): 468-484.
- Shields SM, Ingebritsen TS, Kelly PT (1985). Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions: dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins. *J Neurosci* **5**(12): 3414-3422.

- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkievicz D, *et al* (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* **2**(9): e895.
- Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996). Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11202-11207.
- Smith EE, Jonides J (1999). Storage and executive processes in the frontal lobes. *Science* **283**(5408): 1657-1661.
- Smith JA, Mo Q, Guo H, Kunko PM, Robinson SE (1995). Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res* **683**(2): 264-269.
- Smith SS, Kaplan BE, Sowers LC, Newman EM (1992). Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4744-4748.
- Snyder GL, Fienberg AA, Haganir RL, Greengard P (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* **18**(24): 10297-10303.
- So CH, Verma V, Alijaniam M, Cheng R, Rashid AJ, O'Dowd BF, *et al* (2009). Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that for dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* **75**(4): 843-854.
- Sofuoglu M, Nelson D, Babb DA, Hatsukami DK (2001). Intravenous cocaine increases plasma epinephrine and norepinephrine in humans. *Pharmacol Biochem Behav* **68**(3): 455-459.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**(6289): 146-151.
- Solomon RL, Corbit JD (1974). An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* **81**(2): 119-145.
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997). Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* **17**(3): 960-974.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, *et al* (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5300-5305.
- Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, *et al* (1998). Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7699-7704.
- Squire LR, Clark RE, Knowlton BJ (2001). Retrograde amnesia. *Hippocampus* **11**(1): 50-55.
- Stalnaker TA, Roesch MR, Calu DJ, Burke KA, Singh T, Schoenbaum G (2007). Neural correlates of inflexible behavior in the orbitofrontal-amygdalar circuit after cocaine exposure. *Ann N Y Acad Sci* **1121**: 598-609.
- Stein R, Razin A, Cedar H (1982). In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(11): 3418-3422.
- Strack S, Choi S, Lovinger DM, Colbran RJ (1997). Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J Biol Chem* **272**(21): 13467-13470.
- Strack S, Kini S, Ebner FF, Wadzinski BE, Colbran RJ (1999). Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J Comp Neurol* **413**(3): 373-384.
- Strahl BD, Allis CD (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.

Summers RJ, McMartin LR (1993). Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* **60**(1): 10-23.

Sun L, Liu SY, Zhou XW, Wang XC, Liu R, Wang Q, *et al* (2003). Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience* **118**(4): 1175-1182.

Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, *et al* (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* **350**(6319): 614-619.

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* **14**(2): 385-397.

Suzuki MM, Bird A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* **9**(6): 465-476.

Svenningsson P, Fienberg AA, Allen PB, Moine CL, Lindskog M, Fisone G, *et al* (2000). Dopamine D(1) receptor-induced gene transcription is modulated by DARPP-32. *J Neurochem* **75**(1): 248-257.

Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P (2005). DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS J* **7**(2): E353-360.

Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 269-296.

Svenningsson P, Tzavara ET, Carruthers R, Rachleff I, Wattler S, Nehls M, *et al* (2003). Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science* **302**(5649): 1412-1415.

Swanberg SE, Nagarajan RP, Peddada S, Yasui DH, LaSalle JM (2009). Reciprocal co-regulation of EGR2 and MECP2 is disrupted in Rett syndrome and autism. *Hum Mol Genet* **18**(3): 525-534.

T -

Takagi N (2001). The role of X-chromosome inactivation in the manifestation of Rett syndrome. *Brain Dev* **23 Suppl 1**: S182-185.

Takekoshi H, Yamashita S, Shimazu T, Niwa T, Ushijima T (2009). The presence of RNA polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter CpG islands. *Genome Res* **19**(11): 1974-1982.

Tao J, Hu K, Chang Q, Wu H, Sherman NE, Martinowich K, *et al* (2009). Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(12): 4882-4887.

Terry-Lorenzo RT, Carmody LC, Voltz JW, Connor JH, Li S, Smith FD, *et al* (2002). The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *J Biol Chem* **277**(31): 27716-27724.

Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci* **4**(12): 1217-1223.

Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008). Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* **154**(2): 327-342.

Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (1999). The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J* **18**(17): 4779-4793.

Tiffany ST (1990). A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol Rev* **97**(2): 147-168.

Trojer P, Reinberg D (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**(1): 1-13.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**(5): 355-367.

Tsujita T, Niikawa N, Yamashita H, Imamura A, Hamada A, Nakane Y, *et al* (1998). Genomic discordance between monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry* **155**(3): 422-424.

Turner JD, Pelascini LP, Macedo JA, Muller CP (2008). Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Res* **36**(22): 7207-7218.

U -

Uhl GR, Hall FS, Sora I (2002). Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry* **7**(1): 21-26.

Undie AS, Friedman E (1990). Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **253**(3): 987-992.

Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**(6837): 583-587.

V -

van Holst RJ, Schilt T (2011). Drug-related decrease in neuropsychological functions of abstinent drug users. *Curr Drug Abuse Rev* **4**(1): 42-56.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, *et al* (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**(6319): 610-614.

Vincent S, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982). Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur J Pharmacol* **85**(2): 251-252.

Virshup DM, Shenolikar S (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* **33**(5): 537-545.

Volkow ND, Hitzemann R, Wang GJ, Fowler JS, Wolf AP, Dewey SL, *et al* (1992). Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse* **11**(3): 184-190.

Volkow ND, Wang GJ, Baler RD (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* **15**(1): 37-46.

Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, *et al* (1997). Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* **386**(6627): 827-830.

Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML (1990). Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol* **428**: 313-331.

W -

Waddington CH (2012). The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* **41**(1): 10-13.

Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2003). Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* **278**(21): 18817-18823.

Walaas SI, Greengard P (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *J Neurosci* **4**(1): 84-98.

Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ (2008). Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *J Cell Biochem* **104**(5): 1541-1552.

Wallace DL, Vialou V, Rios L, Carle-Florence TL, Chakravarty S, Kumar A, *et al* (2008). The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *J Neurosci* **28**(41): 10272-10277.

Watt F, Molloy PL (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* **2**(9): 1136-1143.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, *et al* (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**(8): 847-854.

Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, *et al* (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(5): 1859-1863.

Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, *et al* (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285**(5424): 93-96.

White FJ, Kalivas PW (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* **51**(1-2): 141-153.

White NM (1996). Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction* **91**(7): 921-949; discussion 951-965.

Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* **6** : 243-251.

Witkin JM, Goldberg SR (1990). Effects of cocaine on locomotor activity and schedule-controlled behaviors of inbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* **37**(2): 339-342.

Wojak JC, Flamm ES (1987). Intracranial hemorrhage and cocaine use. *Stroke* **18**(4): 712-715.

Wolf ME (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* **54**(6): 679-720.

Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**(5439): 481-486.

Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, *et al* (2005). Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* **12**(2): 111-119.

Woolverton WL (1986). Effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on the self-administration of cocaine and piribedil by rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* **24**(3): 531-535.

Woolverton WL, Virus RM (1989). The effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on behavior maintained by cocaine or food. *Pharmacol Biochem Behav* **32**(3): 691-697.

Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang Z, Cui K, *et al* (2011). Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**(7347): 389-393.

Wu SC, Zhang Y (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 607-620.

Y -

Yamaguchi M, Suzuki T, Abe S, Baba A, Ito T, Okado N (2000). Time-course effects of a single administration of cocaine on receptor binding and subunit mRNAs of GABA(A) receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **81**(1-2): 155-163.

Yan Z, Hsieh-Wilson L, Feng J, Tomizawa K, Allen PB, Fienberg AA, *et al* (1999). Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat Neurosci* **2**(1): 13-17.

Yasui DH, Peddada S, Bieda MC, Vallero RO, Hogart A, Nagarajan RP, *et al* (2007). Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19416-19421.

Yoshimura Y, Yamauchi T (1997). Phosphorylation-dependent reversible association of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic densities. *J Biol Chem* **272**(42): 26354-26359.

Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, *et al* (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17551-17558.

Yung KK, Ng TK, Wong CK (1999). Subpopulations of neurons in the rat neostriatum display GABABR1 receptor immunoreactivity. *Brain Res* **830**(2): 345-352.

Z -

Zachariou V, Benoit-Marand M, Allen PB, Ingrassia P, Fienberg AA, Gonon F, *et al* (2002). Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or Inhibitor 1. *Biol Psychiatry* **51**(8): 612-620.

Zachariou V, Sgambato-Faure V, Sasaki T, Svenningsson P, Berton O, Fienberg AA, *et al* (2006). Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* **31**(3): 555-562.

Zhang Y, Reinberg D (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**(18): 2343-2360.

Zhang Y, Svenningsson P, Picetti R, Schlussman SD, Nairn AC, Ho A, *et al* (2006). Cocaine self-administration in mice is inversely related to phosphorylation at Thr34 (protein kinase A site) and Ser130 (kinase CK1 site) of DARPP-32. *J Neurosci* **26**(10): 2645-2651.

Zhang Z, Bai G, Shima M, Zhao S, Nagao M, Lee EY (1993). Expression and characterization of rat protein phosphatases-1 alpha, -1 gamma 1, -1 gamma 2, and -1 delta. *Arch Biochem Biophys* **303**(2): 402-406.

Zhao S, Lee EY (1997). A protein phosphatase-1-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *J Biol Chem* **272**(45): 28368-28372.

Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao WN, Ho HY, Schmidt L, *et al* (2006). Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* **52**(2): 255-269.

Zhu MY, Klimek V, Dilley GE, Haycock JW, Stockmeier C, Overholser JC, *et al* (1999). Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol Psychiatry* **46**(9): 1275-1286.

Zhu SJ, Kavanaugh MP, Sonders MS, Amara SG, Zahniser NR (1997). Activation of protein kinase C inhibits uptake, currents and binding associated with the human dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **282**(3): 1358-1365.

Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG, *et al* (2001). Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1982-1987.

Rôle de la protéine phosphatase 1 dans les mécanismes d'action de la cocaïne et implication des modifications épigénétiques dans sa régulation.

La consommation répétée de drogues induit une plasticité cérébrale, qui pourrait sous-tendre le développement de la dépendance. La protéine phosphatase de type 1 (PP1) étant un acteur majeur de ces processus, nous nous sommes intéressés à sa régulation par la cocaïne. Nous avons montré qu'un traitement chronique par la cocaïne induit la répression du gène codant la sous-unité catalytique β de PP1 (*PP1C β*), via l'hyperméthylation de sa région promotrice et le recrutement de la protéine de liaison à l'ADN méthylé, MeCP2. Cette répression, observée dans les principales structures du système de récompense du Rat, pourrait favoriser l'état phosphorylé des récepteurs NMDA et AMPA du glutamate et du facteur de transcription CREB, potentialisant ainsi les effets de la cocaïne. PP1 étant souvent considérée comme un régulateur négatif de la mémoire, sa répression pourrait également favoriser la 'mémorisation' du contexte et des habitudes liés à la drogue. L'expression de *PP1C β* a ensuite été analysée en réponse à des injections passives ou volontaires de cocaïne dans un test de conditionnement opérant, l'auto-administration intraveineuse. Étonnamment, une répression similaire de *PP1C β* est observée quel que soit le mode d'administration de la cocaïne. Son expression est par contre différente lorsque la cocaïne est remplacée par de la nourriture : elle est induite par le conditionnement opérant, sans être affectée par une distribution passive de nourriture. Le gène *PP1C β* participe donc sans doute aux neuroadaptations différentielles induites par les drogues et les récompenses naturelles, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension des effets à long terme des drogues.

Mots clés : Cocaïne, protéine phosphatase de type 1, méthylation de l'ADN, MeCP2, auto-administration.

Repeated intake of drugs of abuse is known to induce brain plasticity, which may underlie the development of drug addiction. Protein phosphatase type-1 (PP1) is one of the key proteins involved in brain plasticity mechanisms. We therefore studied its regulation in response to repeated cocaine intake by rats. The gene encoding the β catalytic subunit of PP1 (*PP1C β*) was found to be repressed by chronic cocaine treatment, through a mechanism involving DNA methylation of the *PP1C β* 5'-end followed by the recruitment of the methyl binding protein MeCP2. This repression was observed in the major brain structures of the reward system and probably favors the phosphorylation state of NMDA and AMPA glutamatergic receptors and of CREB transcription factor, thus further increasing cocaine effects. PP1 is also known as a negative regulator of memory formation. Its repression by cocaine may therefore potentiate the 'memorization' of cocaine-related habits and context. *PP1C β* expression was next compared in response to passive vs voluntary cocaine injections in an operant intravenous cocaine self-administration paradigm. Surprisingly, a similar repression of *PP1C β* was found, independently on the cocaine administration mode. A completely different pattern of expression was observed when cocaine administration was replaced by food intake, as *PP1C β* expression was increased during food operant self-administration, but not in response to passive food delivery. Taken together, our data suggest that *PP1C β* participates to the differential neuroadaptations induced by drugs of abuse and natural rewards. They shed some new light on the long-term mechanisms induced by drugs of abuse.

Key words: Cocaine, protein phosphatase type-1, DNA methylation, MeCP2, self-administration.